



Reparación por Escisión de Bases en la planta modelo

Arabidopsis thaliana:

Papel en el procesamiento de lesiones inducidas por agentes alquilantes

Base Excision Repair in the model plant *Arabidopsis thaliana*:
role in processing of DNA damage induced by alkylating agents

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Directora

Dolores Córdoba Cañero

Director

Rafael Rodríguez Ariza

Autor

Casimiro-Miguel Barbado García-Gil

Fecha de depósito:

TITULO: *REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES EN LA PLANTA MODELO
ARABIDOPSIS THALIANA. PAPEL EN EL PROCESAMIENTO DE
LESIONES INDUCIDAS POR AGENTES ALQUILANTES*

AUTOR: *Casimiro-Miguel Barbado García-Gil*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Reparación por Escisión de Bases en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*: Papel en el procesamiento de lesiones inducidas por agentes alquilantes

DOCTORANDO: Casimiro-Miguel Barbado García-Gil

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Tesis Doctoral de D. Casimiro-Miguel Barbado García-Gil se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, en el seno del Grupo “Epigenética y Reparación de ADN” (BIO-301). El desarrollo de la Tesis ha permitido al doctorando adquirir una sólida formación en Genética y Biología Molecular.

La investigación realizada durante la Tesis Doctoral ha permitido desentrañar aspectos moleculares clave de un mecanismo de reparación de ADN que es esencial en todos los organismos, incluidas las plantas. Entre otras conclusiones relevantes, los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que la escisión reparadora de una base dañada no genera un producto equivalente al causado por la pérdida espontánea de dicha base. Este hallazgo pone en entredicho la idea, hasta ahora generalmente aceptada, de que todos los sitios abásicos (sitios AP, sin base) ya sean de origen enzimático o no enzimático, son equivalentes. También arroja luz sobre las funciones biológicas de los dos tipos de enzimas con capacidad para procesarlos (AP liasas y AP endonucleasas).

Los resultados principales obtenidos durante la Tesis se han recogido en la siguiente publicación:

Barbado C., Córdoba-Cañero D., R. R. Ariza R.R. and Roldán-Arjona T. (2018). "Nonenzymatic release of N7-methylguanine channels repair of abasic sites into an AP endonuclease-independent pathway in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci USA* 115(5): E916-E924.

Hay que resaltar que durante la realización de su trabajo, D. Casimiro ha confirmado una excelente aptitud y vocación para la investigación científica, y ha demostrado poseer una espléndida capacidad de trabajo.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 23 de abril de 2018

Firma de los directores

Fdo.: Dra. Dolores Córdoba Cañero

Fdo.: Dr. Rafael Rodríguez Ariza

Índice de contenidos

Índice de figuras	5
Índice de tablas	7
Abreviaturas, siglas y acrónimos	9
Resumen	11
Summary	15
Introducción	19
1. Tipos de lesiones en el ADN	21
1.1. Apareamientos erróneos	21
1.2. Roturas de cadena	22
1.3. Daños en las bases.....	22
1.3.1. Desaminación de bases	23
1.3.2. Pérdida de bases	24
1.3.3. Lesiones fotoquímicas	27
1.3.4. Daño oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno	27
1.3.5. Bases dañadas por reacciones de adición química.....	29
2. Daños inducidos por agentes alquilantes y sus efectos genotóxicos	29
2.1. Clasificación de los agentes alquilantes.....	30
2.2. Principales lesiones causadas por agentes alquilantes.....	31
2.3. N7-meG y sus derivados	32
3. Reparación por escisión de bases	34
4. ADN glicosilasas	36
4.1. Familias de ADN glicosilasas	37
4.2. Mecanismo catalítico de las ADN glicosilasas	39
5. AP endonucleasas	41
5.1. Familias de AP endonucleasas	41
5.2. Mecanismo de acción de las AP endonucleasas	44

6. <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo para el estudio de BER en plantas.....	45
6.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo.....	45
6.2. Estudio de las funciones de mantenimiento de la estabilidad del genoma en <i>Arabidopsis</i>	46
6.3. La ruta BER en <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
6.3.1. AP endonucleasas de <i>Arabidopsis</i>	49
6.3.2. La ADN glicosilasa FPG de <i>Arabidopsis</i>	51
6.3.1. La ADN 3´-fosfatasa ZDP de <i>Arabidopsis</i>	52
Hipótesis y objetivos.....	55
Resultados	59
1. Síntesis y caracterización de los sustratos de ADN	61
2. La ADN 3´-fosfatasa ZDP participa en la ruta de reparación de ADN con N7-meG	63
3. ZDP actúa tras FPG en la ruta de reparación de ADN con N7-meG	64
4. ZDP y FPG interaccionan <i>in vitro</i>	66
5. La inactivación de FPG en los mutantes <i>zdp</i> ^{-/-} restaura la resistencia a MMS	67
6. FPG no procesa N7-meG, sino los sitios abásicos procedentes de su depuración espontánea	69
7. FPG es la principal AP liasa detectable en extractos de <i>Arabidopsis</i>	72
8. El magnesio estimula la actividad AP liasa de FPG	73
9. ARP, la principal AP endonucleasa de <i>Arabidopsis</i> , no participa en la reparación de sitios AP procedentes de la depuración espontánea de N7-meG.....	75
10. El sitio abásico procedente de la depuración espontánea de N7-meG es reparado a través de una ruta SP-BER dependiente de FPG.....	78
11. La escisión no enzimática de N7-meG canaliza la reparación hacia una vía independiente de AP endonucleasas.....	80
12. La identidad de la base enfrentada a un sitio AP generado enzimáticamente influye en la eficiencia relativa de AP endonucleasas y AP liasas.....	82
Discusión	85
1. El papel de FPG y ZDP en la reparación del daño causado por agentes alquilantes en <i>Arabidopsis</i>	87

2. ARP no participa en la reparación de sitios AP generados por depuración espontánea de N7-meG.....	89
3. El origen del sitio AP influye en la elección entre SP-BER y LP-BER.....	91
4. Posibles diferencias entre sitios AP enzimáticos y no enzimáticos.....	92
5. La base huérfana desempeña un importante papel en el procesamiento de sitios AP de origen enzimático	93
Conclusiones	95
Materiales y métodos.....	99
1. Material biológico	101
1.1. Plantas	101
1.2. Cepas bacterianas.....	101
1.3. Vectores de clonación	102
2. Medios de cultivo.....	102
2.1. Cultivo bacteriano	102
2.2. Cultivo de <i>Arabidopsis</i>	102
3. Cultivo y crecimiento de organismos	103
3.1. Cultivo y crecimiento de bacterias	103
3.2. Cultivo y crecimiento de plantas.....	103
3.2.1. Cultivo de plantas en maceta	103
3.2.2. Cultivo de plantas en placas de Petri	103
3.3. Cruzamientos genéticos de <i>Arabidopsis</i>	104
3.4. Estudio de la sensibilidad a genotóxicos	104
4. Oligonucleótidos sintéticos.....	105
4.1. Cebadores empleados para el genotipado de plantas	105
4.2. Oligonucleótidos usados para la preparación de sustratos de ADN	105
4.3. Otros cebadores.....	106
5. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	106
5.1. Aislamiento de ADN plasmídico	106
5.2. Aislamiento de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	107

6. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos.....	107
6.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción	107
6.2. Desfosforilación	107
6.3. Ligación de fragmentos de ADN a vectores plasmídicos.....	107
7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	108
8. Electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas	108
8.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	108
8.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.....	109
8.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	109
9. Transformación de <i>E. coli</i>	111
9.1. Preparación de células competentes.....	111
9.2. Transformación de células competentes.....	111
9.3. Protocolo de transformación "rápida" de <i>E. coli</i>	111
10. Expresión y purificación de proteínas en <i>E. coli</i>	112
10.1. Expresión y purificación de FPG	112
10.2. Expresión y purificación de otras proteínas.....	113
11. Aislamiento de extractos celulares de la planta.....	113
12. Análisis de la actividad enzimática	114
12.1. Hibridación de oligonucleótidos.....	114
12.2. Preparación de los sustratos de ADN	114
12.3. Validación de los sustratos.....	115
12.4. Ensayos de incisión.....	116
12.5. Ensayos de inserción de desoxinucleótidos con extractos.....	116
13. Análisis de la interacción entre proteínas mediante ensayos <i>pull-down</i>	117
13.1. <i>Pull-down</i> usando MBP-ZDP como proteína cebo y His-FPG como presa	117
13.2. <i>Pull-down</i> usando His-FPG como cebo y MBP-ZDP como presa	117
14. Detección de proteínas mediante Western Blot.....	118
Bibliografía.....	121
Publicación	135

Índice de figuras

Figura 1. Productos de desaminación de las bases nitrogenadas.	24
Figura 2. Mecanismo de depurinación espontánea de la guanina.	25
Figura 3. Equilibrio entre las distintas conformaciones de los sitios abásicos.	26
Figura 4. Principales lesiones causadas por daño oxidativo en las bases del ADN.	28
Figura 5. Representación de los principales agentes alquilantes mono y bifuncionales.	30
Figura 6. Principales centros nucleofílicos en las bases del ADN susceptibles de alquilación.	31
Figura 7. Inducción de N7-meG por reacción del MMS con el ADN.	33
Figura 8. Formación de sitios abásicos y me-FAPy-G a partir de N7-meG.	34
Figura 9. Esquema de la ruta de reparación por escisión de bases en mamíferos.	35
Figura 10. Estructura tridimensional de ADN glicosilasas representativas de cada superfamilia.	36
Figura 11. Mecanismo catalítico de las ADN glicosilasas.	40
Figura 12. Actividades de las AP endonucleasas.	41
Figura 13. Estructura de hAPE1, ExoIII y la DNasaI.	42
Figura 14. Estructura de EndoIV.	43
Figura 15. Mecanismo catalítico de hAPE1.	44
Figura 16. Esquema de la ruta de reparación por escisión de bases en <i>Arabidopsis</i>	48
Figura 17. Diagrama esquemático de los dominios funcionales de hAPE1 y las AP endonucleasas de <i>Arabidopsis</i>	49
Figura 18. Representación esquemática de la estructura de PNKP y ZDP.	52
Figura 19. Actividad ADN 3'-fosfatasa de ZDP.	53
Figura 20. Esquema de la síntesis de un sustrato con N7-meG en una posición definida y su conversión a me-FAPy-G.	61
Figura 21. Caracterización de los sustratos de ADN N7-meG:C y me-FAPy-G:C.	62
Figura 22. ZDP procesa intermediarios de reparación con extremos 3'-P generados durante la reparación de ADN con N7-meG.	63
Figura 23. Identificación de plantas mutantes <i>fpg</i> ^{-/-}	64

Figura 24. ZDP actúa tras FPG durante la reparación de ADN con N7-meG.....	65
Figura 25. ZDP y FPG interaccionan <i>in vitro</i>	67
Figura 26. La inactivación del gen <i>FPG</i> en los mutantes <i>zdp</i> ^{-/-} restaura la resistencia a MMS.	68
Figura 27. FPG no procesa N7-meG ni me-FAPy-G, sino sitios AP.....	70
Figura 28. FPG procesa los sitios abásicos procedentes de la depurinación espontánea de N7-meG.....	71
Figura 29. FPG es la única AP liasa detectable en extractos celulares de <i>Arabidopsis</i>	73
Figura 30. Los iones Mg ²⁺ estimulan la actividad AP liasa de FPG.	74
Figura 31. Los extractos deficientes en FPG y ARP escinden uracilo con la misma eficiencia que los extractos silvestres.	76
Figura 32. ARP no participa en la reparación de sitios AP generados por depurinación espontánea de N7-meG.....	77
Figura 33. Los sitios AP procentes de la depurinación espontánea de N7-meG se reparan a través de una vía SP-BER dependiente de FPG.....	79
Figura 34. ARP discrimina entre los sitios AP generados por escisión enzimática de la N7-meG y los producidos por su depurinación espontánea.	81
Figura 35. La AP endonucleasa humana 1 no discrimina entre sitios AP generados por liberación enzimática o no enzimática de N7-meG.	82
Figura 36. La identidad de la base opuesta al sitio abásico influye en la actividad AP endonucleasa y AP liasa.	83
Figura 37. La identidad de la base opuesta al sitio abásico influye en procesamiento de hAPE1.	84
Figura 38. Modelo de la ruta de reparación de sitios AP en <i>Arabidopsis</i>	88

Índice de tablas

Tabla 1. Principales lesiones generadas en el ADN bicatenario en el genoma de mamíferos.	23
Tabla 2. Principales lesiones generadas por agentes alquilantes.	32
Tabla 3. Líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> empleadas.	101
Tabla 4. Cepas bacterianas.	101
Tabla 5. Cebadores para el genotipado de plantas.	105
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la preparación de sustratos de ADN.	105
Tabla 7. Condiciones estándar de PCR.	108

Abreviaturas, siglas y acrónimos

3'-PUA: 3'-polyunsaturated aldehyde, extremo 3' aldehído α , β -insaturado del ADN

3'-OH: extremo 3' hidroxilo del ADN

5-meC: 5-metilcitosina

5'-P: 5'-phosphate, extremo 5' fosfato del ADN

5'-dRP: 5'-deoxyribose-phosphate, extremo 5' deoxirribofosfato del ADN

8-oxoG: 8-oxoguanina

aa: aminoácido

ABRC: *Arabidopsis Biological Resource Center*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ADN-T: ADN transferente que *A. tumefaciens* inyecta en plantas dicotiledóneas y que se integra en el genoma de las mismas.

AP: abásico (sitioapurínico o apirimidínico)

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARP: *Apurinic endonuclease redox protein*

BER: *Base Excision Repair*, mecanismo de reparación por escisión de bases

CpG: -C-phosphate-G-, un nucleótido citosina seguido de una guanina en una secuencia de bases, 5'-CG-3'

CTAB: *Cetyl trimethylammonium bromide*, bromuro de hexadeciltrimetilamonio

dNTPs: *deoxynucleotide triphosphates*, desoxinucleótidos trifosfato

DO₆₀₀: densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros

DSB: *Double-Strand Break*, rotura de cadena doble

DTT: ditioneitol

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetracético

FPG: *formamidopyrimidine DNA glycosylase*, formamidopirimidina ADN glicosilasa (se emplea FPG para *Arabidopsis* y EcoFpg o Fpg para *E. coli*)

hAAG: *human alkyladenine DNA glycosylase*, alquiladenina ADN glicosilasa humana

hAPE1: *human AP endonuclease 1*, AP endonucleasa 1 humana

HhH-GPD: motivo hélice-horquilla-hélice seguido de Glicina, Prolina y ácido aspártico (D)

IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*, Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

kb: kilobase

kDa: kilodalton

LP-LER: *long-patch* BER, inserción de varios desoxinucleótidos a través de BER

MBP: *Maltose Binding Protein*, proteína de unión a maltosa

me-FAPy-G: 2,6-diamino-hidroxi-5-N-metil-formamidopirimidina

M: molar

MMS: *metil metanosulfonato*

MS: *Murashige and Skoog basal medium*

N7-meG: N7-*metilguanina*

p/v: relación peso/volumen

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: *par(es) de base(s)*

PCR: *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PNKP: *polynucleotide kinase 3'-phosphatase*, polinucleótido quinasa 3'-fosfatasa

rpm: *revoluciones por minuto*

SAM: *S-adenosilmetionina*

SDS: *sodium dodecyl sulfate*, dodecil sulfato sódico

SP-BER: *short-patch* BER, inserción de un solo desoxinucleótido a través de BER

SSB: *Single-Strand Break*, rotura de cadena simple

UDG: *uracil DNA glycosylase*, uracil ADN glicosilasa

v/v: relación volumen/volumen

ZDP: *zinc finger DNA 3' phosphoesterase*

Resumen

El ADN es la molécula portadora de la información genética, pero continuamente sufre daños entre los que destacan oxidaciones o alquilaciones de bases. La adición de grupos alquilo puede provenir de fuentes endógenas, como la S-adenosilmetionina (SAM), o de agentes externos como el metil metanosulfonato (MMS), que induce mayoritariamente N7-metilguanina (N7-meG). Uno de los principales mecanismos de defensa frente a los daños en el ADN es la ruta de reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER). Esta ruta es iniciada por ADN glicosilasas, que liberan la base dañada y generan como producto un sitio abásico (sitio AP) que puede ser procesado por AP endonucleasas. Sin embargo, algunas ADN glicosilasas, denominadas bifuncionales, realizan una incisión en el sitio AP mediante una actividad AP liasa. Un subconjunto de tales ADN glicosilasas/AP liasas generan intermediarios con un extremo 3'-P que ha de ser procesado por una fosfatasa de ADN para continuar la reparación.

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral parte de la observación de que plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la ADN 3'-fosfatasa ZDP son sensibles a MMS. Puesto que la lesión más frecuente inducida por este agente alquilante es la N7-meG, se planteó la hipótesis de que durante la reparación de N7-meG o de alguno de sus derivados se generan intermediarios con extremos 3'-P por acción de una ADN glicosilasa/AP liasa.

Los resultados obtenidos indican que la ADN glicosilasa/AP liasa FPG de *Arabidopsis* desempeña un papel esencial en la respuesta de la planta al MMS, ya que inicia la reparación de sitios AP procedentes de la pérdida espontánea de N7-meG. La incisión catalizada por FPG genera un intermediario con un extremo 3'-P que es hidrolizado a 3'-OH por la actividad ADN 3'-fosfatasa de ZDP. La idea generalmente aceptada es que los sitios AP de origen no enzimático son equivalentes a los generados enzimáticamente por ADN glicosilasas y que ambos pueden ser procesados por AP liasas o por AP endonucleasas. Sin embargo, en este trabajo se demuestra que la principal AP endonucleasa de *Arabidopsis* (ARP) procesa sitios AP procedentes de la escisión enzimática de N7-meG, pero no aquellos generados por la pérdida espontánea de dicha base. Por tanto, los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren la existencia de diferencias previamente no detectadas entre sitios AP enzimáticos y no enzimáticos. También arrojan luz sobre las funciones desempeñadas por AP liasas y AP endonucleasas, ayudando a entender la relevancia biológica de ambas clases de enzimas para el mantenimiento de la información genética.

Summary

DNA is the carrier of genetic information but it is continuously subjected to base damage, such as oxidation or alkylation. Addition of alkyl groups to DNA bases arises both from endogenous sources, such as S-adenosylmethionine (SAM), and external agents such as methyl methanesulfonate (MMS), which mainly induces N7-methylguanine (N7-meG). A major protection mechanism against DNA damage is the Base Excision Repair pathway (BER). This pathway is initiated by DNA glycosylases, which release the damaged base and generate an abasic site (AP site) that may be processed by AP endonucleases. However, some DNA glycosylases are endowed with an AP lyase activity that cleaves the sugar-phosphate backbone. A subset of such bifunctional DNA glycosylases/AP lyases generate DNA repair intermediates with a blocking 3'-P end that must be processed by a DNA phosphatase to continue the repair pathway.

The research work performed in this PhD Thesis originated from the observation that *Arabidopsis thaliana* plants deficient in DNA 3'-phosphatase ZDP are sensitive to MMS. Since the most abundant DNA lesion induced by this alkylating agent is N7-meG, we hypothesized that during the repair of N7-meG or some of its derivatives DNA repair intermediates with 3'-P ends are generated by the action of a DNA glycosylase/AP lyase.

Results obtained indicate that the DNA glycosylase/AP lyase FPG of *Arabidopsis* plays an essential role in the MMS-induced DNA damage response in plants, since it initiates repair of AP sites from spontaneous base loss or N7-meG. Incision catalysed by FPG at AP sites generates a repair intermediate with a 3'-P end which is hydrolysed to 3'-OH by the DNA 3'-phosphatase activity of ZDP, thus allowing repair completion. It is generally accepted that AP sites arising from spontaneous base loss and those produced through enzymatic removal by DNA glycosylases have analogous biochemical properties and are equivalent substrates for AP endonucleases and AP lyases. However, this work shows that the major AP endonuclease in *Arabidopsis* (ARP) incises AP sites generated by enzymatic N7-meG excision, but not those resulting from spontaneous N7-meG loss. These findings, which reveal previously undetected differences between products of enzymatic and nonenzymatic base release, shed light on the evolution and biological roles of AP endonucleases and AP lyases.

Introducción

1. Tipos de lesiones en el ADN

A pesar de ser el portador de la información genética, el ADN posee una estabilidad química limitada. Su integridad estructural se encuentra continuamente amenazada por una gran variedad de agentes, ya sean de origen endógeno o exógeno (Lindahl, 1993). Las alteraciones sufridas por el genoma comienzan generalmente con cambios en la estructura molecular del ADN. Estas alteraciones se denominan daños o lesiones, debido a que afectan al funcionamiento normal de la macromolécula, perturbando procesos como la replicación o la transcripción (Friedberg, 2006).

Ante la presencia de lesiones en su ADN, las células despliegan dos estrategias para evitar las consecuencias citotóxicas que se derivarían de no poder replicar su genoma o transcribir genes esenciales. Una de ellas consiste en repararlas, restaurando la estructura y secuencia originales del ADN. Otra estrategia consiste en tolerarlas, aunque, en algunos casos, esto conlleve la aparición de mutaciones, es decir, cambios en la secuencia de ADN (Friedberg *et al.*, 1995).

Las lesiones en el ADN pueden surgir como consecuencia de errores cometidos durante la replicación, por la acción de agentes genotóxicos endógenos o exógenos, o por la inestabilidad intrínseca que la molécula de ADN posee, incluso en condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Desde un punto de vista estructural el daño en el ADN se clasifica en apareamientos erróneos, roturas de cadena y daños en las bases (Friedberg, 2006).

1.1. Apareamientos erróneos

Los apareamientos erróneos durante la síntesis de ADN constituyen una parte importante de las alteraciones producidas en el metabolismo normal del material genético. La mayor parte se originan por errores intrínsecos de las ADN polimerasas replicativas. Otra fuente adicional es el reordenamiento transitorio y espontáneo de los enlaces de las bases, denominado tautomerismo, aunque su contribución real a la tasa de errores durante la replicación del ADN se desconoce (Morgan, 1993). Uno de los principales factores responsables de la fidelidad en la replicación del ADN es la existencia de actividades "correctoras" (*proofreading*) asociadas a las polimerasas de ADN replicativas. La mejor estudiada es probablemente la actividad 3'-5' exonucleasa asociada a la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*, que cataliza la hidrólisis de uno en uno de los desoxinucleótidos que, en el extremo de la cadena en crecimiento, no se encuentran apareados con la cadena molde. De esta forma, la polimerasa "verifica" el resultado de cada incorporación antes de pasar a colocar el siguiente desoxinucleótido. En general, se propone que la fidelidad de las polimerasas de ADN es el resultado de la interacción entre su especificidad a la hora de

incorporar un nuevo desoxinucleótido y su capacidad para eliminarlo mediante una actividad correctora si no lo ha incorporado correctamente. La fidelidad de las polimerasas se ve favorecida además por la presencia de proteínas accesorias en la horquilla de replicación. Todos estos factores disminuyen la frecuencia de errores durante la síntesis *in vitro* de ADN a un nivel promedio de 10^{-7} . La frecuencia de errores *in vivo* es, sin embargo, todavía menor, de alrededor de 10^{-10} , debido a la existencia de mecanismos encargados de reparar los apareamientos incorrectos una vez que ha pasado la horquilla de replicación (Friedberg *et al.*, 1995).

1.2. Roturas de cadena

Las roturas de cadena sencilla (*Single Strand Breaks*, SSBs) surgen con relativa frecuencia como consecuencia de daños en los residuos de desoxirribosa del esqueleto azúcar-fosfato, inducidos, entre otros, por especies reactivas de oxígeno (ERO), fallos en el funcionamiento de la Topoisomerasa 1 (TOP1), colisiones con ARN polimerasas o debido a la proximidad de otro tipo de lesiones como sitios abásicos (Pourquier *et al.*, 1997). También surgen como productos intermediarios durante la reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER, Introducción, apartado 3) (Caldecott, 2008).

Las roturas de cadena doble (*Double Strand Breaks*, DSBs) pueden surgir como consecuencia de cortes producidos en regiones de cadena simple, debido al estrés mecánico de un cromosoma o durante la iniciación de sobrecruzamientos en la meiosis. También se pueden generar DSBs como consecuencia del daño producido en el esqueleto azúcar-fosfato por ERO o radiación ionizante. De hecho, la mayoría de los efectos letales de este tipo de radiación se atribuyen a este tipo de lesiones (Breen and Murphy, 1995). Las DSBs tienen un gran impacto en el funcionamiento de la célula ya que son altamente genotóxicas y suelen conducir a procesos de muerte celular (Dikomey *et al.*, 1998). En eucariotas superiores una sola DSB no reparada que inactive un gen esencial puede ser suficiente para inducir la muerte celular por apoptosis (Rich *et al.*, 2000).

1.3. Daños en las bases

Todos los componentes del ADN (bases, azúcares y enlaces fosfodiéster) son susceptibles de sufrir daños. Sin embargo, las bases, portadoras de la información genética, constituyen una de las principales dianas. Los daños en las bases abarcan procesos hidrolíticos que producen su pérdida o su desaminación, reacciones de oxidación y reacciones de adición de grupos (Tabla 1). La depurinación espontánea y la metilación de la guanina son los daños más frecuentes producidos en las bases.

Tabla 1. Principales lesiones generadas en el ADN bicatenario en el genoma de mamíferos.

Fuente del daño	N.º lesiones/día
Hidrólisis	
Depurinación	18.000
Depirimidinación	600
Desaminación de la citosina	100
Desaminación de 5-meC	10
Oxidación	
8-oxoguanina	1.000-2.000
Pirimidinas con anillo saturado (timinglicol)	2.000
Productos de peroxidación de lípidos (eteno-A)	1.000
Metilación no enzimática por S-adenosilmetionina	
N7-metilguanina	6.000
N3-metiladenina	1.200
Metilación no enzimática por poliaminas y péptidos	
O ⁶ -metilguanina	20-100

Adaptado de Lindahl and Barnes, 2000.

1.3.1. Desaminación de bases

Tres de las cuatro bases presentes normalmente en el ADN (citosina, adenina, guanina), así como la modificación epigenética 5-metilcitosina (5-meC), contienen grupos amino exocíclicos. La pérdida de estos grupos ocurre espontáneamente mediante reacciones de hidrólisis dependientes de pH y temperatura, dando lugar a la conversión de las bases afectadas en uracilo, hipoxantina, xantina y timina, respectivamente (Lindahl, 1993) (Figura 1). Dado que la pérdida del grupo amino afecta a la capacidad de apareamiento de la base afectada, ésta puede originar apareamientos incorrectos que posteriormente den lugar a mutaciones durante la replicación semiconservativa del ADN.

La citosina y su derivado 5-meC son las bases que sufren desaminación espontánea con mayor frecuencia. La desaminación de citosina produce uracilo, transformando un par C:G en un par U:G que, si no es reparado antes de la replicación, genera una transición CG→TA. (Poole *et al.*, 2001). La desaminación de 5-meC genera un par incorrecto T:G, con idéntico potencial mutagénico.

La desaminación de adenina y guanina, aunque con mucha menos frecuencia, también tiene lugar en condiciones fisiológicas, generando hipoxantina y xantina, respectivamente. La hipoxantina aparea con citosina y su presencia genera transiciones AT→GC, mientras que la xantina aparea tanto con citosina como con timina, lo que distorsiona la hélice y bloquea la replicación (Eritja *et al.*, 1986; Kulikowska *et al.*, 2004).

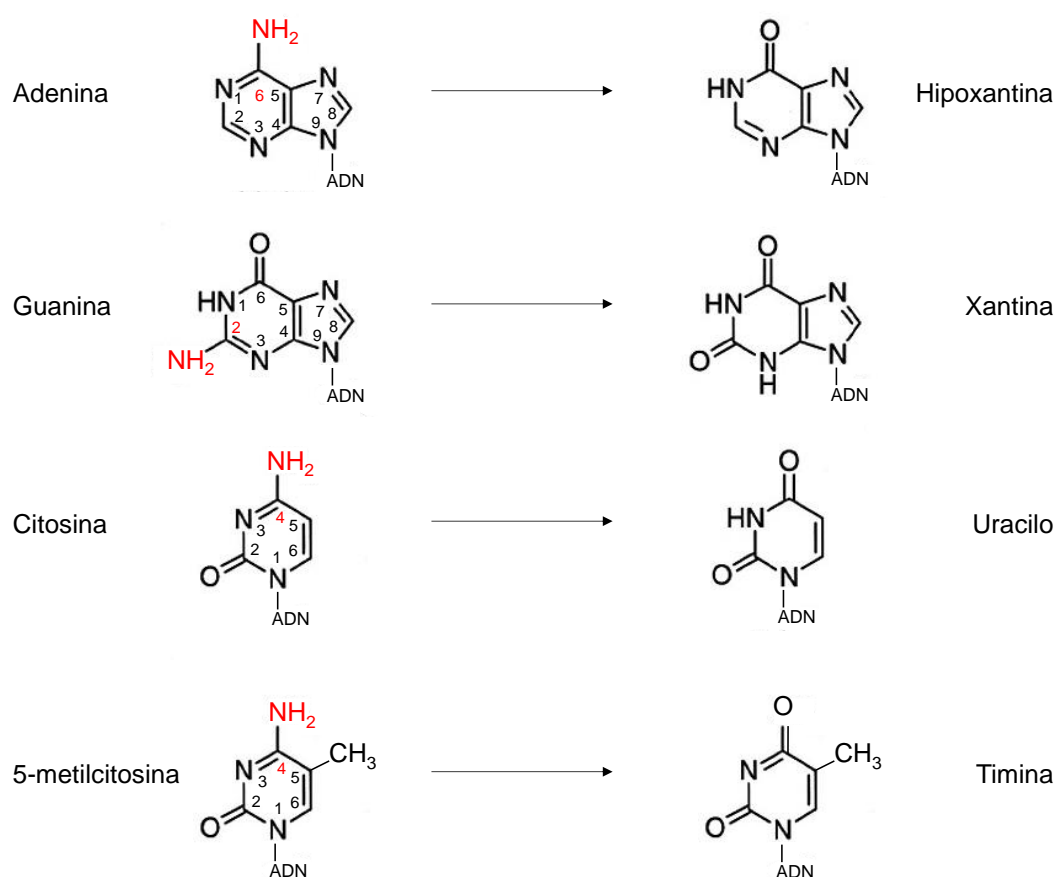


Figura 1. Productos de desaminación de las bases nitrogenadas. Se indica la posición de los grupos amino en color rojo. Adaptado a partir de Friedberg *et al.*, 2006.

1.3.2. Pérdida de bases

Los enlaces N-glicosídicos del ADN son más susceptibles a sufrir reacciones de hidrólisis que los del ARN, y su rotura da lugar a la pérdida de bases, es decir, a la depuración o depirimidinación de la macromolécula. En el punto donde tiene lugar una depuración o depirimidinación se genera un sitio apurínico o apirimidínico (denominado, de forma general, sitio abásico o sitio AP). Se ha estimado que existe una pérdida de 18.000 purinas al día (Lindahl and Barnes, 2000), siendo la pérdida espontánea de bases, principalmente purinas, la mayor fuente de sitios AP. La pérdida espontánea de las bases puede ocurrir a pH fisiológico (Lindahl and Nyberg, 1972), aunque la adición de grupos alquilo (Lawley and Brookes, 1963) o la radiación (Dunlap and Cerutti, 1975) puede debilitar el enlace N-glicosídico y acelerar este proceso. Los sitios AP son, además, intermediarios clave en la ruta BER, al ser generados tras la escisión de la base dañada por parte de ADN glicosilasas (Introducción, apartado 4).

El mecanismo propuesto para explicar la depurinación de las bases es una catálisis ácida (Figura 2), en la que la base se protona a pH bajo, generando una carga positiva que favorece la rotura del enlace N-glicosídico, con la consecuente liberación de la base, generándose un intermediario del tipo oxocarbenio. Aunque el mecanismo de depirimidinización es el mismo que el de depurinación, los nucleósidos de pirimidina poseen un enlace N-glicosídico más estable, por lo que la tasa de pérdida de pirimidinas es unas 30 veces inferior a la de purinas (Lindahl and Karlstrom, 1973).

Los sitios abásicos se encuentran en equilibrio entre distintas formas (Figura 3). Este equilibrio varía en función de la secuencia y de la base huérfana, pero se ha determinado que la forma mayoritaria es la hemiacetálica (más del 98%), que a su vez presenta dos anómeros, α y β , según la orientación del grupo OH del carbono anomérico. La forma aldehído representa tan solo el 1%, mientras que el aldehído hidratado es una forma casi indetectable (Beger and Bolton, 1998).

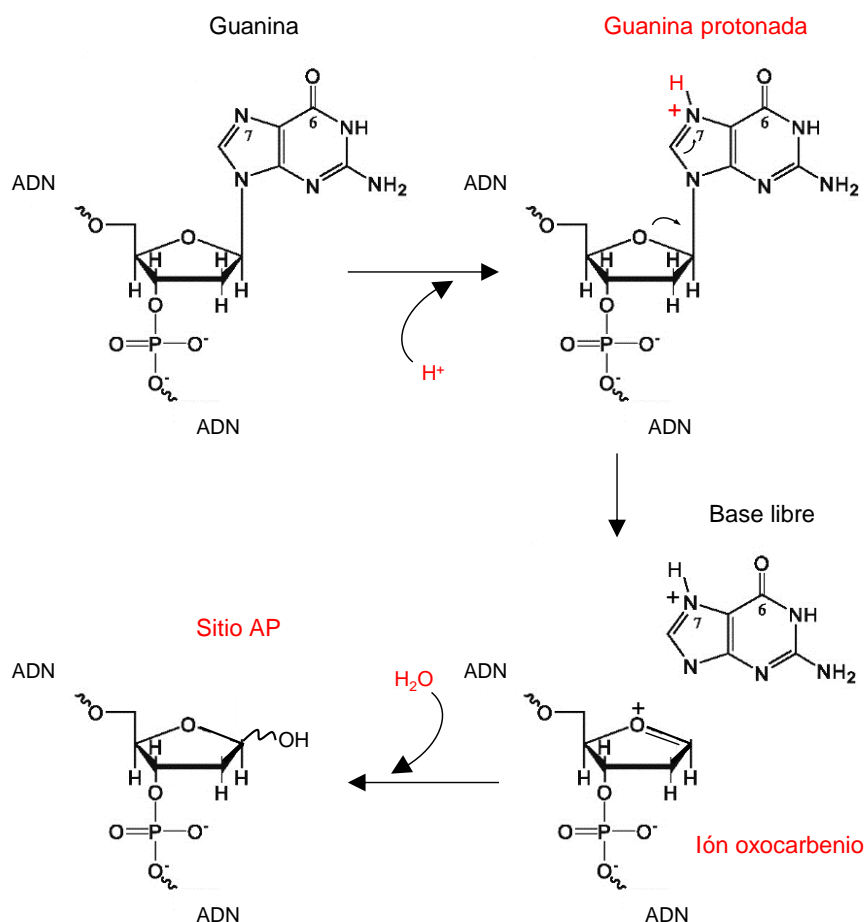


Figura 2. Mecanismo de depurinación espontánea de la guanina. La guanina en condiciones ácidas reacciona con un protón, generándose una base cargada. Esta base es muy inestable, y se favorece una rotura del enlace N-glicosídico, produciéndose un sitio AP. Modificado de DePamphilis, 2006.

Los sitios AP son mutagénicos por naturaleza, ya que la ausencia de base en el esqueleto azúcar fosfato supone una falta de molde durante la síntesis de ADN. Con frecuencia las ADN polimerasas sobrepasan los sitios AP insertando dAMP (un fenómeno denominado 'Regla de la A') (Loeb *et al.*, 1986). Por otro lado, aunque los sitios AP no son citotóxicos por sí mismos son muy lábiles en su forma aldehído abierta, ya que el enlace 3'-fosfodiéster puede ser hidrolizado en una reacción de β -eliminación en la que el carbono β de la pentosa es activado a pH alcalino. Esta rotura de la forma aldehído produce una SSB que, si es alcanzada por una horquilla de replicación, puede generar una DSB.

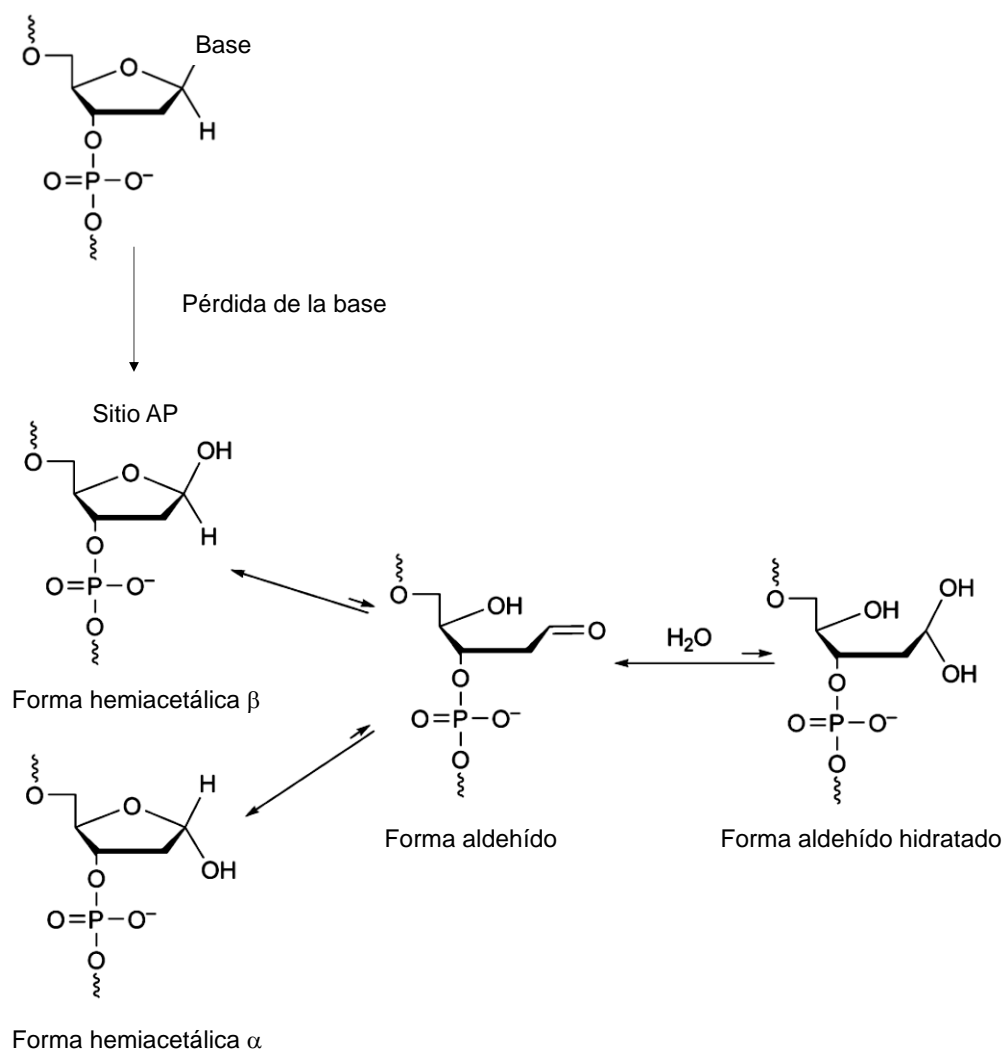


Figura 3. Equilibrio entre las distintas conformaciones de los sitios abásicos. La pérdida de la base genera un sitio abásico, que se encuentra en un equilibrio en el que predomina la forma hemiacetalica, que presenta a su vez dos anómeros, en función de la orientación del OH del carbono anomérico, los isómeros α y β . La forma aldehído es minoritaria, mientras que su forma hidratada es casi indetectable. Modificado a partir de Stone *et al.*, 2011.

Los sitios AP, al igual que las bases, pueden sufrir procesos de oxidación. La oxidación del C1' de la desoxirribosa provoca la pérdida de la base y la generación de un sitio AP oxidado o 2'-desoxirribonolactona (dL) (Demple and DeMott, 2002) que, dada su inestabilidad, puede originar SSB fácilmente.

1.3.3. Lesiones fotoquímicas

La principal fuente de alteraciones fotoquímicas en el ADN es la radiación ultravioleta (UV), y genera, entre otras lesiones, dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (*Cyclobutane Pyrimidine Dimer*, CPD). Estos dímeros surgen a partir de dos pirimidinas adyacentes que se enlazan covalentemente mediante la formación de un ciclo de 4 carbonos generado por la saturación de sus dobles enlaces C5-C6. Los dímeros de tipo ciclobutano distorsionan la estructura de la doble hélice, lo que supone un serio obstáculo para la replicación (Liu *et al.*, 2016; Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2011). Un segundo tipo de lesión inducida por luz UV son los dímeros pirimidina-pirimidona 6-4, más conocidos como fotoproductos 6-4. Estos dímeros se generan por la unión del carbono 6 de una pirimidina y el carbono 4 de la pirimidina adyacente. Los fotoproductos 6-4, al igual que los dímeros tipo ciclobutano, tienen consecuencias citotóxicas (Friedberg, 2006; Mitchell and Nairn, 1989), aunque la distorsión generada en la doble hélice es aún mayor. Otras lesiones fotoquímicas producidas por la luz UV son los hidratos de pirimidina, producidos por la adición de una molécula de agua al doble enlace C5-C6 (Boorstein *et al.*, 1989) o por la acción de especies reactivas de oxígeno.

1.3.4. Daño oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno

El ataque por especies reactivas de oxígeno (ERO) es una de las principales fuentes de daño al ADN y a otras macromoléculas, tales como proteínas, lípidos y carbohidratos. El daño oxidativo al ADN es una de las principales causas de mutación espontánea y se ha propuesto su implicación en diversas enfermedades degenerativas, procesos cancerosos y envejecimiento (Beckman and Ames, 1997). Las especies reactivas de oxígeno están asociadas a la vida aeróbica y pueden tener un origen intra o extracelular. Las principales fuentes intracelulares de ERO se encuentran en las mitocondrias y los cloroplastos. Así, durante la respiración mitocondrial se generan potentes agentes oxidantes tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Valentine *et al.*, 1998). Otras fuentes de ERO incluyen el metabolismo de los peroxisomas y la síntesis enzimática de óxido nítrico. En mamíferos también se generan ERO durante los procesos inflamatorios que implican a macrófagos y neutrófilos. Las ERO también pueden tener su origen en fuentes exógenas, entre las que se incluyen oxidantes químicos tales

como H_2O_2 , fármacos antitumorales como la bleomicina o radiaciones UV e ionizante (Valentine *et al.*, 1998).

Aunque las ERO pueden atacar el esqueleto azúcar-fosfato del ADN, generando SSB (Breen and Murphy, 1995) o pérdidas de bases (Dunlap and Cerutti, 1975; Teoule, 1987), su principal diana son las bases nitrogenadas. Hasta la fecha se han descrito más de 100 tipos diferentes de bases oxidadas (Dizdaroglu *et al.*, 2002; Lee and Wallace, 2017) (Figura 4), siendo la guanina la más susceptible a sufrir reacciones de oxidación. Entre las lesiones más frecuentes generadas por daño oxidativo cabe destacar la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoguanina u 8-oxoG) y la 2,6-diamino-hidroxi-5-formamidopirimidina, más conocida como FAPy-G. Ambas lesiones generan transversiones GC→TA, debido a su capacidad de aparear erróneamente con adenina. Históricamente, se ha considerado a la 8-oxoG como el producto de oxidación más abundante en el ADN, aunque la acumulación de FAPy-G es, en algunos casos, mayor que la de 8-oxoG (Dizdaroglu *et al.*, 2008).

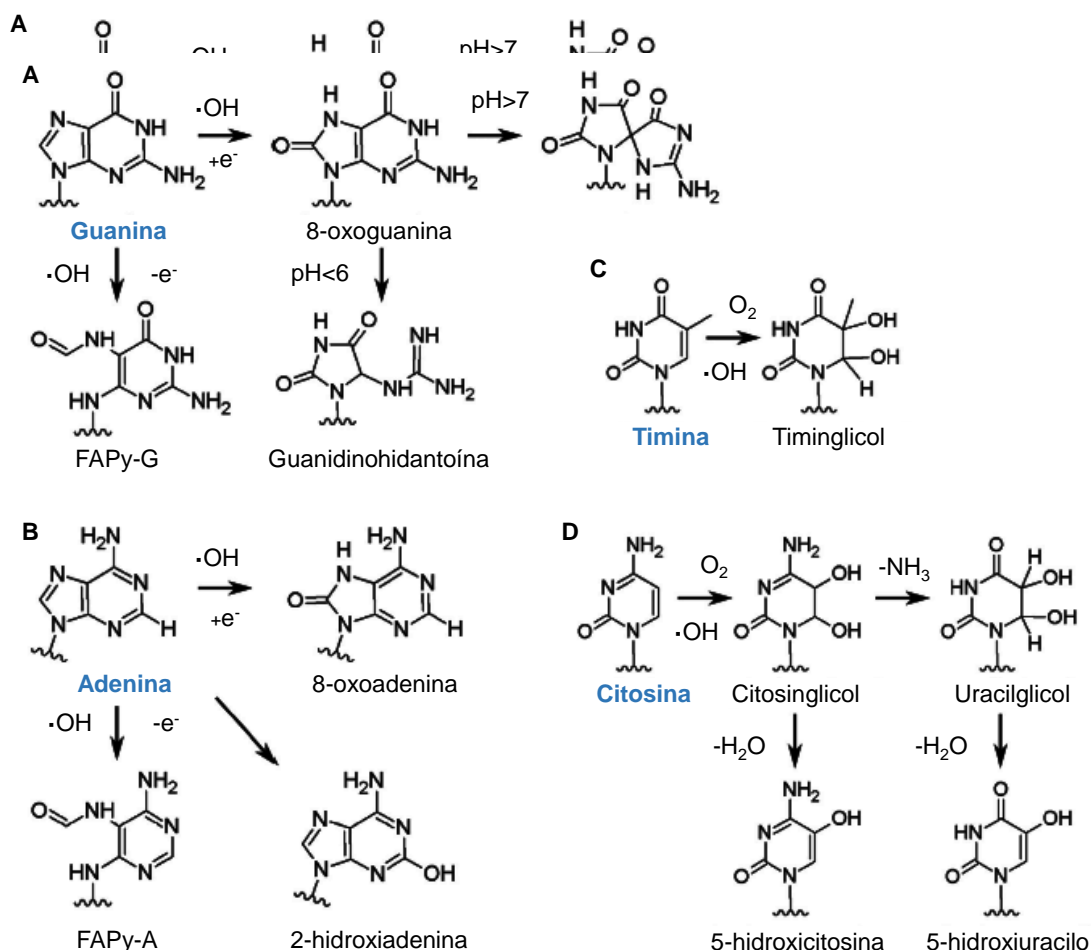


Figura 4. Principales lesiones causadas por daño oxidativo en las bases del ADN. Lesiones derivadas de guanina (A), adenina (B), timina (C) y citosina (D) por reacción con distintos radicales oxidantes ($\cdot\text{OH}$, e^- , O_2). Adaptado de Lee y Wallace, 2017.

1.3.5. Bases dañadas por reacciones de adición química

Existe una gran variedad de compuestos químicos que, de forma directa o tras un proceso de activación metabólica, reaccionan con centros nucleofílicos del ADN y forman enlaces covalentes mediante reacciones de adición. Un ejemplo es el 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), una amina aromática cuya activación metabólica da lugar a un derivado altamente reactivo que ataca preferentemente a residuos de guanina (Beland, 1989). Otro ejemplo es el benzo[*a*]pireno, un potente carcinógeno cuya metabolización genera epóxidos electrofílicos, como el benzo[*a*]pireno *anti* diol-epóxido (BPDE), que también reaccionan con centros nucleofílicos de la guanina (Selkirk, 1980).

Las aflatoxinas son potentes carcinógenos producidos por hongos del género *Aspergillus*, entre las que se destaca la aflatoxina B1. Este compuesto entra en las células por difusión pasiva y, a través de oxigenasas celulares, es activado a aflatoxina-B1-8,9-epóxido. Este derivado reacciona con el N7 de la guanina, generándose 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxaflatoxina B1, que desestabiliza la base, generando un sitio abásico. Además, el anillo de imidazol puede abrirse, formando FAPy-aflatoxina B1 (Smela *et al.*, 2001). Los aldehídos, como la acroleína, pueden unirse covalentemente al ADN y a proteínas, formando enlaces cruzados ADN-proteína (Kozekov *et al.*, 2003).

No obstante, entre los compuestos químicos capaces de formar enlaces covalentes con el ADN los más estudiados son los agentes alquilantes.

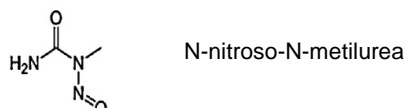
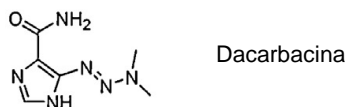
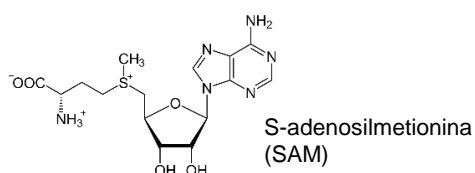
2. Daños inducidos por agentes alquilantes y sus efectos genotóxicos

Los agentes alquilantes son compuestos de naturaleza electrofílica, con gran afinidad por centros nucleofílicos de macromoléculas orgánicas, capaces de modificar covalentemente el ADN mediante la adición de grupos alquilo, cloroetilo o platino. A menudo, las lesiones causadas por agentes alquilantes son mutagénicas y citotóxicas (Bordin *et al.*, 2013). La adición de grupos alquilo a las bases cambia frecuentemente sus propiedades de apareamiento. En otros casos la alquilación genera una carga positiva que debilita el enlace N-glicosídico y favorece su rotura, generando sitios abásicos. Por otra parte, ciertas bases alquiladas bloquean la horquilla de replicación. Debido a sus efectos genotóxicos, algunos agentes alquilantes se emplean como quimioterapéuticos con el fin de impedir la división de las células cancerígenas (Fu *et al.*, 2012).

2.1. Clasificación de los agentes alquilantes

En función de su origen, los agentes alquilantes se clasifican en exógenos o endógenos, según procedan de fuentes externas o del metabolismo propio de las células, respectivamente. Existe una amplia variedad de agentes alquilantes exógenos, como el clorometano (MeCl) o la estreptozotocina, un antibiótico producido por la bacteria edáfica *Streptomyces achromogenes*, que le permite competir con otros microorganismos del suelo (Sedgwick and Vaughan, 1991). Uno de los agentes alquilantes endógenos más relevantes es la S-adenosilmetionina (SAM), que interviene en multitud de reacciones enzimáticas como un eficiente donador de grupos metilo.

Agentes alquilantes monofuncionales



Agentes alquilantes bifuncionales

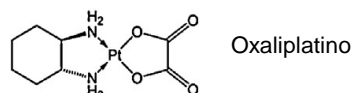
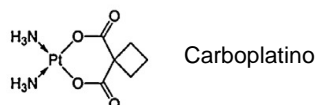
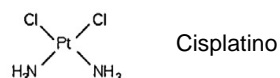
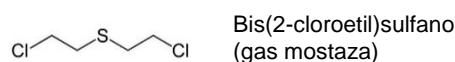
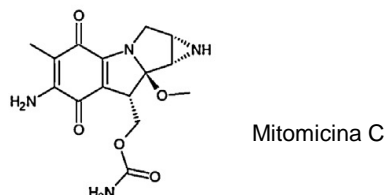


Figura 5. Representación de los principales agentes alquilantes mono y bifuncionales. La capacidad de reaccionar con uno o dos centros nucleofílicos permite su clasificación en monofuncionales y bifuncionales.

En función del número de centros nucleofílicos con los que son capaces de reaccionar, los agentes alquilantes pueden clasificarse en monofuncionales y bifuncionales (Figura 5). La naturaleza de las lesiones inducidas y sus consecuencias biológicas serán también distintas. Los agentes alquilantes monofuncionales, como el metil metanosulfonato (MMS), introducen grupos alquilo y generan lesiones poco voluminosas. Los agentes alquilantes bifuncionales, como los derivados del platino o la mitomicina C, suelen generar lesiones más complejas, enlazando bases de la misma o de distintas cadenas del ADN, así como enlaces cruzados entre ADN y proteínas.

2.2. Principales lesiones causadas por agentes alquilantes

Los daños que generan los agentes alquilantes en el ADN son diversos y dependen del número de centros nucleofílicos con los que el agente alquilante reaccione, la estructura del grupo alquilo entrante y la reactividad de los átomos de las distintas bases (Figura 6).

Los agentes alquilantes bifuncionales, como la mitomicina C o el gas mostaza, capaces reaccionar con hasta dos centros nucleofílicos, generan enlaces cruzados intercatenarios, entre dos guaninas o una guanina y una adenina de distintas cadenas. Este tipo de lesiones impide la separación de las dos hebras de ADN y, por tanto, impiden la replicación y la transcripción del ADN. Los enlaces cruzados intracatenarios son generados principalmente por compuestos derivados del platino, y provocan en una gran inestabilidad termodinámica de la molécula de ADN (Poklar *et al.*, 1996).

Generalmente, los agentes alquilantes monofuncionales, como el MMS, reaccionan cediendo un grupo metilo al N7 de la guanina o el N3 de la adenina, generando mayoritariamente las lesiones N7-metilguanina (N7-meG) y N3-metiladenina (N3-meA), respectivamente (Tabla 2).

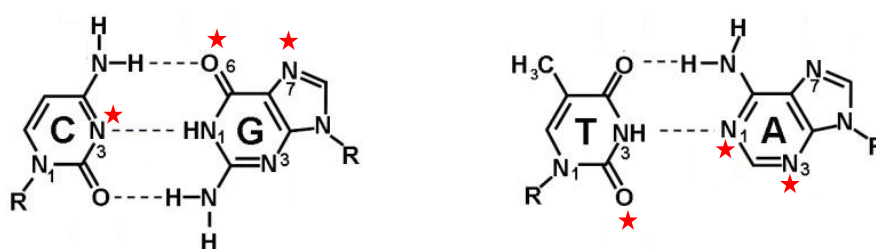


Figura 6. Principales centros nucleofílicos en las bases del ADN susceptibles de alquilación.

La estructura en B del ADN orienta a las bases y confiere distinta reactividad a sus átomos. Las posiciones más reactivas se señalan en rojo. R: esqueleto azúcar-fosfato. Adaptado de Sedgwick, 2004.

La N3-meA bloquea la replicación debido a la perturbación del grupo metilo sobre el contacto que realiza la polimerasa sobre el surco menor del ADN (Shrivastav et al., 2010). La N7-meG no ejerce efectos citotóxicos directos, pero es inestable y puede generar sitios abásicos (Gates et al., 2004). No obstante, la alquilación de las bases no siempre genera una lesión lábil o citotóxica. La O⁶-metilguanina (O⁶-meG), por ejemplo, es una lesión mutagénica muy estable, que provoca transiciones de G→A, dada la gran estabilidad del apareamiento incorrecto O⁶-meG:T (Erickson et al., 1980).

Tabla 2. Principales lesiones generadas por agentes alquilantes.

Aducto	N-nitroso-N-metilurea	Metil metanosulfonato	N-nitroso-N-etilurea
N1-alquiladenina	0,7 ^a	1,2	0,3
N3-alquiladenina	8,0	11,0	4,0
N7-alquiladenina	1,5	1,9	0,4
N3-alquilguanina	0,8	0,7	0,6
N7-alquilguanina	68	83,0	12,0
O ⁶ -alquilguanina	7,5	0,3	8,0
N3-alquilitosina	0,5	-	0,2
O ² -alquilitosina	0,1	-	3,0
N3-alquiltimina	0,3	-	0,8
O ² -alquiltimina	0,1	-	7,0
O ⁴ -alquiltimina	0,1-0,7	-	1-4

^a Los porcentajes indican la proporción relativa de bases alquiladas en el ADN después de reaccionar con agentes alquilantes carcinogénicos. Adaptado de Pegg, 1984. Las posiciones exocíclicas de las bases se numeran con superíndices.

2.3. N7-meG y sus derivados

El MMS es un agente alquilante monofuncional, muy empleado en estudios genéticos y bioquímicos, que genera principalmente N7-meG (83 %) y en menor proporción N3-meA (11 %) (Tabla 2) (Beranek, 1990; Pegg, 1984).

La N7-meG (Figura 7) no tiene consecuencias citotóxicas por sí misma ya que no genera una perturbación en la conformación tridimensional del ADN. Tampoco tiene consecuencias mutagénicas ya que aparea correctamente con citosina (Ezaz-Nikpay and Verdine, 1994). Sin embargo, la metilación en la posición N7 de la guanina, aumenta la carga positiva del anillo de imidazol, favoreciendo así la rotura espontánea del enlace N-glicosídico y la pérdida de la base (Lawley and Brookes, 1963). Este hecho conlleva la aparición de un sitio abásico con efectos citotóxicos y mutagénicos.

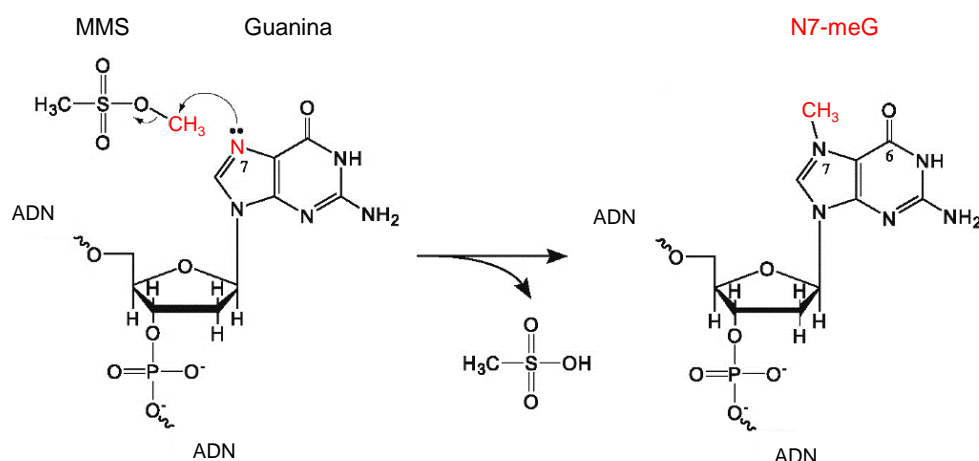


Figura 7. Inducción de N7-meG por reacción del MMS con el ADN. Los agentes alquilantes reaccionan con átomos específicos de las bases. La reactividad está gobernada por la propia naturaleza de la base, la secuencia nucleotídica y la disposición tridimensional que el ADN adopta. Así, el agente alquilante monofuncional MMS reacciona principalmente con el nitrógeno 7 de la guanina, generando N7-metilguanina. Adaptado de DePamphilis, 2006.

El mecanismo químico más aceptado para explicar la depurinación espontánea de N7-meG del ADN es una hidrólisis del tipo $\text{S}_{\text{N}}1$, también conocida como DN^*AN , donde * indica la generación de un intermediario de vida corta del tipo carbocatión o ion oxocarbenio. En este tipo de reacciones, la disociación de la base metilada, es seguida por la adición de una molécula de agua (Gates *et al.*, 2004) (Figura 8).

Por otro lado, la N7-meG puede sufrir la apertura del anillo de imidazol a pH básico, generando 2,6-diamino-hidroxi-5-N-metil-formamidopirimidina (me-FAPy-G) (Chetsanga and Lindahl, 1979) (Figura 8). La apertura del anillo de imidazol genera una relocalización de la carga en el anillo de pirimidina, permitiendo la estabilidad del enlace N-glicosídico.

La relocalización de la carga tiene una gran relevancia biológica ya que, a diferencia de la N7-meG, la me-Fapy-G posee una mayor estabilidad y no es propensa a sufrir depurinación espontánea. Sin embargo, puede bloquear la síntesis de ADN (Boiteux and Laval, 1983). A diferencia de FAPy-G, su análogo no metilado, su capacidad para aparear de forma incorrecta es muy reducida (Asagoshi *et al.*, 2002).

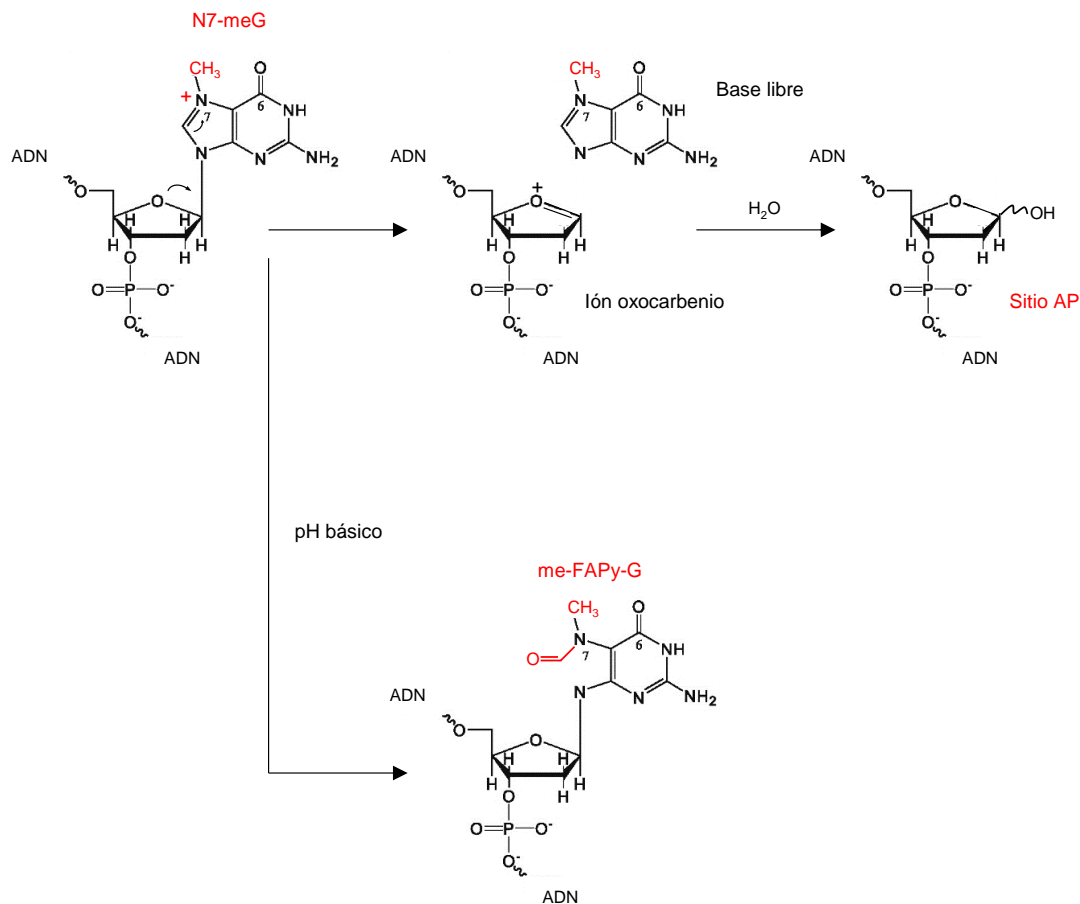


Figura 8. Formación de sitios abásicos y me-FAPy-G a partir de N7-meG. La metilación en la posición N7 de la guanina aumenta la carga positiva de la base y fomenta su salida, generando un sitio AP. A pH básico se fomenta la apertura del anillo de imidazol de la N7-meG generando me-FAPy-G. Modificado de DePamphilis, 2006.

3. Reparación por escisión de bases

La reparación del ADN es crucial para proteger las células contra el daño genotóxico y asegurar la fidelidad en la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente. Una de las principales líneas de defensa frente a lesiones causadas por el propio metabolismo celular o por agentes genotóxicos medioambientales es la reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER) (Dianov and Hubscher, 2013).

La ruta BER consta de varias etapas (Figura 9) y se inicia por la acción de enzimas denominadas ADN glicosilasas que reconocen la base dañada y catalizan la hidrólisis del enlace N-glicosídico que la une al esqueleto azúcar-fosfato, generando por tanto un sitio AP potencialmente citotóxico y mutagénico. Los sitios AP pueden ser procesados por AP endonucleasas. Sin embargo, algunas ADN glicosilasas son bifuncionales y están dotadas de una actividad AP liasa que cataliza una incisión en el esqueleto azúcar-fosfato.

Por tanto, los sitios AP pueden ser procesados por dos vías diferentes, vía AP endonucleasas o vía AP liasas (Friedberg *et al.*, 1995).

Las AP endonucleasas son enzimas dependientes de magnesio que cortan en el lado 5' del sitio AP, generando intermediarios de reparación con extremos 3'-hidroxilo (3'-OH) y 5'-desoxirribofosfato (5'-dRP). El extremo 5'-dRP debe ser posteriormente procesado por una desoxirribosa-fosfato diesterasa (dRPasa), para generar un extremo 5'-fosfato (5'-P) adecuado para la polimerización y la ligación final (Lindahl *et al.*, 1997). Por su parte, la actividad AP liasa suele estar asociada a ADN glicosilasas bifuncionales, aunque también puede encontrarse en otras proteínas. Esta actividad no requiere magnesio y corta en el lado 3' del sitio AP mediante β -eliminación generando intermediarios de reparación con extremos 3'-aldehído insaturados (3'-PUA). Un subconjunto de ADN glicosilasas/AP liasas catalizan una reacción de β , δ -eliminación y por tanto generan extremos 3'-fosfato (3'-P). En células humanas los 3'-PUA y 3'-P son convertidos a 3'-OH por acción de la AP endonucleasa 1 (*human AP endonuclease 1*, hAPE1) (Pascucci *et al.*, 2002), y de PNKP (*Polynucleotide kinase phosphatase*) (Jilani *et al.*, 1999), respectivamente.

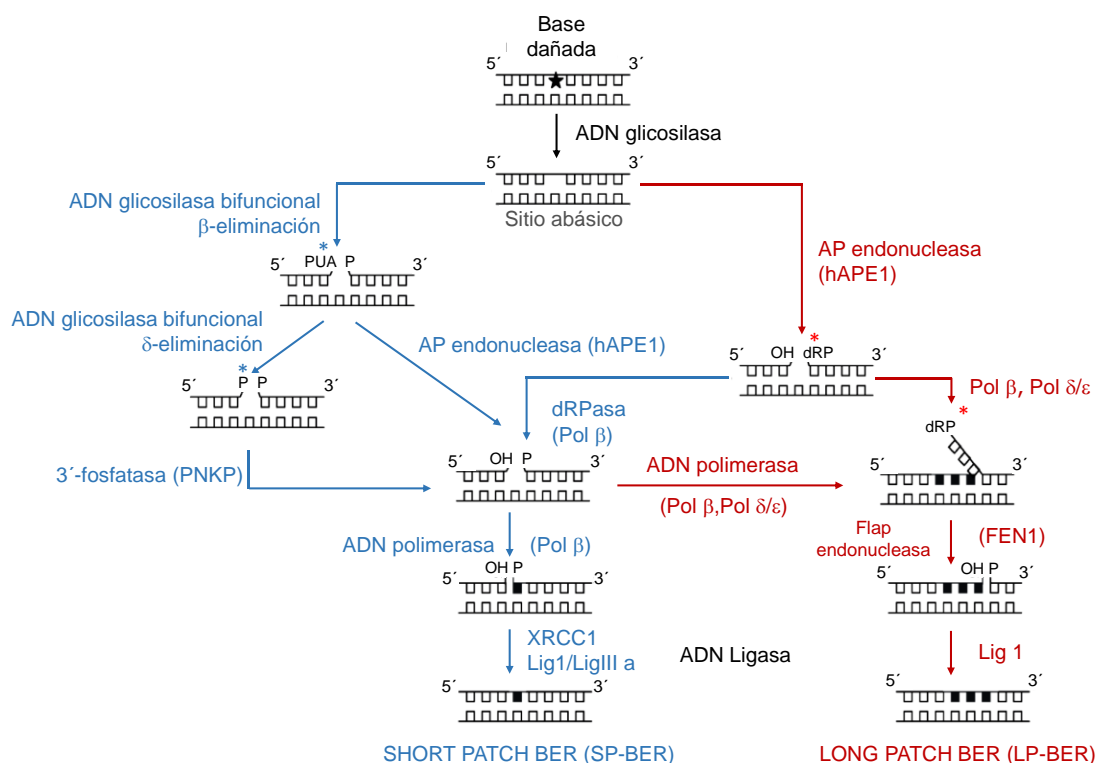


Figura 9. Esquema de la ruta de reparación por escisión de bases en mamíferos. Los extremos 3'-P, 3'-PUA y 5'-dRP de los intermediarios de reparación generados (marcados con asterisco) no permiten la polimerización y la ligación del hueco, y han de ser procesados para completar la reparación mediante síntesis de ADN y ligación. Ver texto para más detalles. Modificado a partir de Baute and Depicker, 2008.

Tras la incisión del sitio AP, la restauración de la cadena puede completarse mediante la inserción de uno (*short-patch*, SP) o varios desoxinucleótidos (*long-patch*, LP) (Fortini *et al.*, 1999). Ambas sub-rutas han sido ampliamente estudiadas en mamíferos. Así, en la reparación vía SP participa la ADN polimerasa β (Pol β), cuya actividad dRPasa intrínseca (Singhal *et al.*, 1995) permite procesar el extremo 5'-dRP. Finalmente, la cadena es sellada por la ADN ligasa IIIa con la participación de la proteína de andamiaje XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing Protein 1*) (Nash *et al.*, 1997).

En la reparación vía LP no se requiere actividad dRPasa, por lo que probablemente Pol β se limite a incorporar el primer desoxinucleótido (Podlutzky *et al.*, 2001), mientras que la elongación y desplazamiento de cadena son llevados a cabo por las ADN polimerasas replicativas Pol δ y/o Pol ϵ (Fortini *et al.*, 1998). La cadena desplazada es eliminada por acción de la endonucleasa FEN1 (*Flap endonuclease 1*), y la cadena es finalmente sellada por la ADN Ligasa I (Levin *et al.*, 1997).

4. ADN glicosilasas

Las ADN glicosilasas descritas hasta la fecha son enzimas monoméricas, generalmente pequeñas, con un peso molecular en un rango entre 15 y 45 kDa, y que no requieren cofactores para su actividad enzimática (Krokan *et al.*, 1997). Existen distintos tipos de ADN glicosilasas, cada una de las cuales reconoce un tipo específico de lesión o un rango de lesiones químicamente relacionadas.

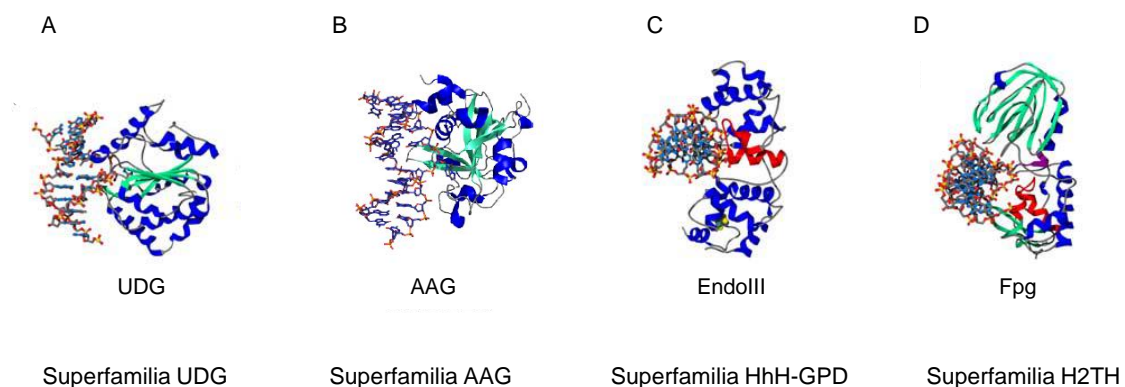


Figura 10. Estructura tridimensional de ADN glicosilasas representativas de cada superfamilia. Las α -hélices se representan en azul y las láminas β en turquesa. (A) Superfamilia UDG. (B) Superfamilia AAG (PDB ID 3QI5). (C) Superfamilia HhH-GPD. Motivos hélice-horquilla-hélice en rojo. (D) Superfamilia H2TH. Motivos hélice-doble vuelta-hélice en rojo. Modificado a partir de Huffman *et al.*, 2005.

4.1. Familias de ADN glicosilasas

A pesar de utilizar mecanismos muy similares para reconocer y eliminar bases dañadas, la determinación de la estructura tridimensional de varias ADN glicosilasas ha revelado que existen cuatro superfamilias estructuralmente diferentes: Uracil ADN glicosilasa (UDG), alquiladenina ADN glicosilasa (AAG), hélice-horquilla-hélice (HhH-GPD) y hélice-doble vuelta-hélice (H2TH) (Hitomi *et al.*, 2007) (Figura 10).

Superfamilia UDG

La superfamilia de uracil ADN glicosilasas constituye una gran familia, ampliamente estudiada, que incluye, al menos, cinco familias definidas en base a la conservación de residuos en el sitio activo y a la especificidad por su sustrato. Aunque las diferentes familias muestran una similitud de secuencia limitada, todas ellas poseen un núcleo común que consiste en cuatro hojas β paralelas rodeadas al menos por dos α -hélices a cada lado (Aravind and Koonin, 2000). La primera UDG identificada fue la enzima UNG de *Escherichia coli* (Lindahl, 1974) que tipifica la ubicua Familia-1 de glicosilasas UDG. Esta familia altamente conservada está representada en organismos eucariotas, bacterias y arqueobacterias. Las enzimas de la Familia-1 reconocen uracilo en una conformación extrahelicoidal y son activas sobre ADN mono y bicatenario. Las enzimas de la Familia-2, representadas por Mug de *E. coli* y la TDG humana, son específicas de apareamientos erróneos, muestran dependencia de ADN bicatenario y contactan con la guanina opuesta en la cadena complementaria. La Familia-3 está representada por SMUG1 de vertebrados, es activa sobre ADN mono y bicatenario y tiene una especificidad más amplia que la Familia-1. Las UDG de las familias 4 y 5 han sido identificadas en bacterias termofílicas y arqueobacterias.

Superfamilia AAG

Las alquiladenina ADN glicosilasas no se relacionan estructuralmente con ninguna de las otras superfamilias, aunque reconocen y eliminan la base dañada de manera semejante (Berti and McCann, 2006; Lau *et al.*, 1998) a través de un mecanismo ácido/base general (O'Brien and Ellenberger, 2003). Sus miembros poseen un único dominio compacto consistente en una hoja β antiparalela rodeada de α -hélices, similar al dominio C-terminal de la formiltransferasa de metionina (Baute and Depicker, 2008).

Las enzimas de esta superfamilia han evolucionado discriminando la presencia de grupos amino exocíclicos (6-amino en adenina y 2-amino en guanina), evitando la escisión de purinas normales. La hipoxantina y la etenoadenina, que carecen de estos grupos amino exocíclicos, son sus mejores sustratos (O'Brien and Ellenberger, 2004). Estas enzimas también catalizan la escisión de N7-meG y N3-meA, bases que sí poseen grupos amino

exocíclicos. Se ha propuesto que la carga positiva de N7-meG y N3-meA facilita el reconocimiento por el sitio activo de la ADN glicosilasa. Además, como se ha descrito antes (Introducción, apartado 2.3), la carga positiva en la base debilita el enlace N-glicosídico, por lo que, con una mínima asistencia catalítica, las bases metiladas pueden ser escindidas del ADN fácilmente en comparación a las purinas sin metilar (Lau *et al.*, 2000).

La alquilpurina ADN glicosilasa humana (MPG o hAAG), es una de las ADN glicosilasas mejor caracterizadas (Asaeda *et al.*, 2000; O'Brien and Ellenberger, 2003, 2004; Samson *et al.*, 1991). Esta enzima escinde N7-meG, N3-meA e hipoxantina, entre otras lesiones. En *Arabidopsis* se ha descrito un homólogo de hAAG, AthAAG, capaz de escindir N3-meA (Santerre and Britt, 1994).

Superfamilia HhH-GPD

Este grupo de ADN glicosilasas es el más diverso, con amplias diferencias en cuanto a especificidad de sustrato entre sus miembros. Las proteínas pertenecientes a esta superfamilia reparan diversas lesiones generadas por oxidación, alquilación y daño hidrolítico. Algunas ADN glicosilasas pertenecientes a esta superfamilia son Nth (*Endonuclease three*), la 3-metiladenina ADN glicosilasa II de *E. coli* (AlkA) (Thomas *et al.*, 1982), Ogg1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase 1*) y la adenina ADN glicosilasa MutY, entre otras (Huffman *et al.*, 2005).

Su estructura básica consiste en cuatro α -hélices en su dominio N-terminal, y de seis a siete en su dominio C-terminal, unidas por una horquilla β tipo II (Doherty *et al.*, 1996) El motivo HhH fue descubierto en Nth y permite la unión al ADN, independientemente de su secuencia (Thayer *et al.*, 1995). Este dominio está seguido por un bucle con residuos de glicina (G), prolina (P), y un residuo invariante de ácido aspártico (D), esencial para la actividad catalítica (Huffman *et al.*, 2005), conformando el motivo GPD. Algunos miembros de esta superfamilia, como Nth y MutY, presentan cuatro residuos de cisteína ligados a cuatro átomos de hierro, formando un complejo sulfoférrico [4Fe-4S] que desempeña un papel estructural en la unión al ADN (Fromme and Verdine, 2003).

El motivo HhH no es exclusivo de las ADN glicosilasas de esta superfamilia, sino que además se encuentra en la ADN polimerasa β y en ADN ligasas dependientes de NAD (Doherty *et al.*, 1996).

Superfamilia H2TH

Las glicosilasas pertenecientes a esta superfamilia poseen un dominio C-terminal consistente en un motivo hélice-doble vuelta-hélice (H2TH), que permite la unión al ADN. A esta superfamilia pertenecen tanto las enzimas bacterianas Fpg (*formamidopyrimidine DNA glycosylase*, también conocida como MutM) (Chetsanga and Lindahl, 1979) y EndoVIII de

E. coli (Jiang *et al.*, 1997), así como la proteína humana NEIL (*Endonuclease eight-like*) (Hazra *et al.*, 2002), todas implicadas en la reparación de lesiones generadas por daño oxidativo como 8-oxoG y FAPy-G.

Las proteínas de esta superfamilia poseen un dominio N-terminal con una estructura con dos hojas β antiparalelas que forman un complejo flanqueado por hélices (Huffman *et al.*, 2005). El dominio C-terminal contiene el motivo H2TH, característico de esta superfamilia y un dedo de zinc, que se intercala en el surco menor del ADN (Coste *et al.*, 2004; Fromme and Verdine, 2002, 2003; Gilboa *et al.*, 2002).

Los dominios N- y C-terminal forman un bolsillo en el que los residuos positivos generan una fuerza electroestática que permite la unión al ADN (Huffman *et al.*, 2005). Las enzimas de esta familia conservan en el extremo N-terminal un residuo de prolina que cataliza la reacción inicial de β -eliminación, mientras que los residuos internos de lisina y arginina permiten la generación del producto final mediante δ -eliminación (Zharkov *et al.*, 2003).

4.2. Mecanismo catalítico de las ADN glicosilasas

Las ADN glicosilasas poseen mecanismos catalíticos y de reconocimiento de la base similares (Figura 11) (Krokan *et al.*, 1997; Labahn *et al.*, 1996). Todas las ADN glicosilasas identificadas hasta la fecha escinden la base diana en una conformación extrahelicoidal. Este proceso distorsiona el ADN, orientando la base dañada fuera de la doble hélice e insertando la base en un bolsillo hidrofóbico de la enzima, permitiendo el ataque nucleofílico al carbono anomérico C1', que une la base al esqueleto azúcar-fosfato (Huffman *et al.*, 2005).

Las ADN glicosilasas monofuncionales catalizan la hidrólisis del enlace N-glicosídico entre el N y el C1' usando como nucleófilo una molécula de agua activada, generando como productos la base libre y un sitio abásico.

Por el contrario, las ADN glicosilasas bifuncionales utilizan como nucleófilo el grupo amino de un residuo altamente conservado de la propia proteína, lo que da lugar a la formación de una base de Schiff como intermediario de la reacción. Este intermediario sufre a continuación una reacción de β - o β , δ -eliminación, generando como productos finales la base libre y un hueco en el ADN con extremos 3' bloqueados (3'-PUA o 3'-P) y un extremo 5'-P (Levin and Demple, 1990).

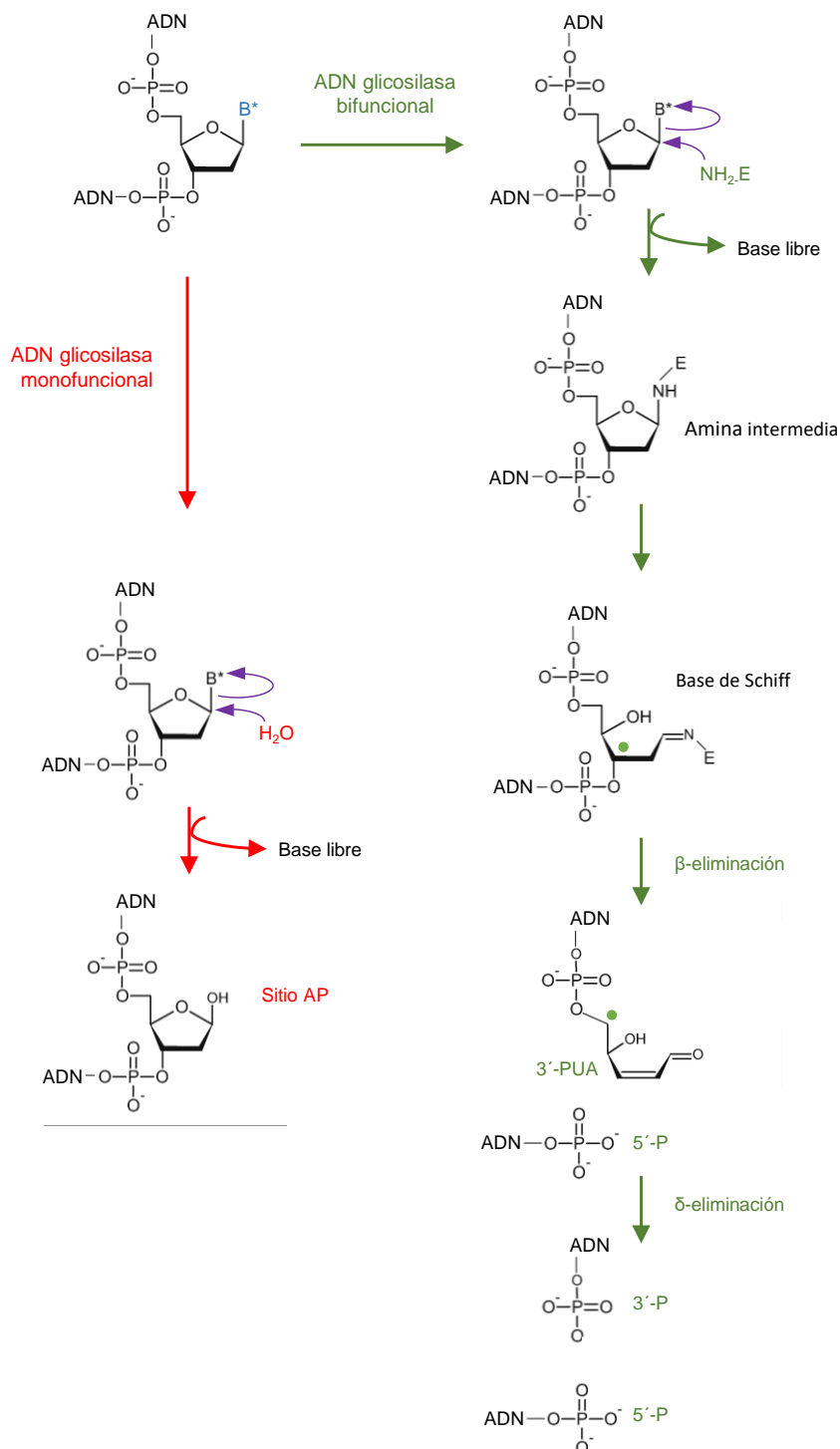


Figura 11. Mecanismo catalítico de las ADN glicosilasas. Las ADN glicosilasas emplean un mecanismo catalítico similar de ataque al C1' de la desoxirribosa para escindir la base dañada (B^* , en azul), en el que sólo varía la molécula que actuará como nucleófilo. El punto de ataque del nucleófilo se señala con flechas moradas. En rojo se muestra el mecanismo catalítico de ADN glicosilasas monofuncionales y en verde el de las bifuncionales. Ver texto para más detalles. Modificado a partir de Baute and Depicker, 2008.

5. AP endonucleasas

Las AP endonucleasas son enzimas esenciales en la ruta BER implicadas en el procesamiento de sitios abásicos. Estas enzimas catalizan la rotura del enlace C3'-O-P del sitio AP generando como producto de reacción un hueco mononucleotídico con extremos 3'-OH y 5'-dRP (Figura 12). Aunque los principales sustratos de las AP endonucleasas son los sitios AP, también procesan otros intermediarios de reparación, como por ejemplo aquellos con extremos 3'-PUA o 3'-P, gracias a la actividad 3'-fosfodiesterasa (Chen *et al.*, 1991) o ADN 3'-fosfatasa (Seki *et al.*, 1991) asociada a algunas AP endonucleasas (Figura 12).

5.1. Familias de AP endonucleasas

Las AP endonucleasas se engloban dentro de dos familias según su homología con las endonucleasas de *E. coli*, exonucleasa III (Exo III) o endonucleasa IV (Endo IV). Estudios estructurales de las enzimas representativas de estas dos familias han revelado similitudes y diferencias en el procesamiento de los sitios AP.

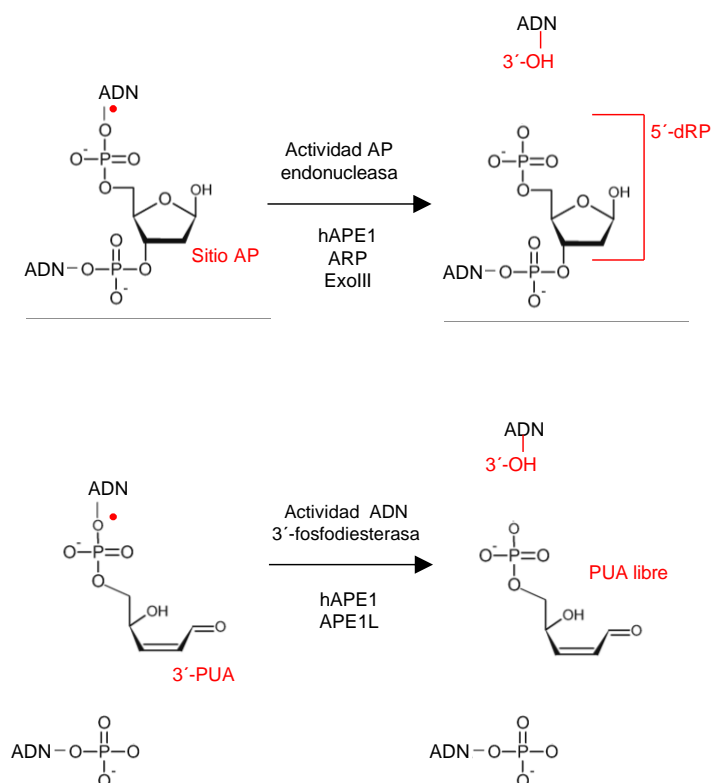


Figura 12. Actividades de las AP endonucleasas. Las AP endonucleasas catalizan principalmente la hidrólisis de los sitios AP, generando un intermediario de reparación con extremos 3'-OH y 5'-dRP. También son capaces de reconocer otros sustratos, como extremos 3'-PUA de intermediarios de reparación. En rojo se señalan los puntos de ataque de la AP endonucleasa.

Familia ExoIII

La familia de AP endonucleasas ExoIII está compuesta por proteínas relacionadas estructuralmente a ExoIII de *E. coli*. Son proteínas pequeñas, monoméricas, de entre 30 a 40 KDa, con una estructura común, similar a la de la DNAasaI: un plegamiento de cuatro capas de láminas α/β (Figura 13). Las AP endonucleasas de esta familia son estrictamente dependientes de magnesio.

La principal AP endonucleasa humana, hAPE1, es una proteína monomérica de 35 KDa perteneciente a esta familia. Al igual que ExoIII, es capaz de procesar, además de sitios AP, otros sustratos, como intermediarios de reparación con extremos 3' -PUA. La proteína hAPE1 tiene tres dominios: un primer dominio carboxilo terminal similar a ExoIII, encargado del procesamiento de los sustratos, en el que comparte con ExoIII los principales residuos catalíticos (Gorman *et al.*, 1997).

Los otros dos dominios no están conservados en ExoIII. Así, el segundo dominio está compuesto por los 35 primeros residuos aminoacídicos del extremo N-terminal y se encarga de la unión a otras proteínas, la modulación de la actividad endonucleasa y la unión a ARN.

Finalmente, el tercer dominio, conocido como el dominio N-terminal principal, que comprende desde el residuo 35 hasta el 127, es responsable de la función redox de esta proteína (Xanthoudakis *et al.*, 1994), entre los que se destacan cinco residuos de cisteína. El dominio redox de hAPE1 permite reducir a determinados factores de transcripción, facilitando su unión a ADN (Georgiadis *et al.*, 2008).

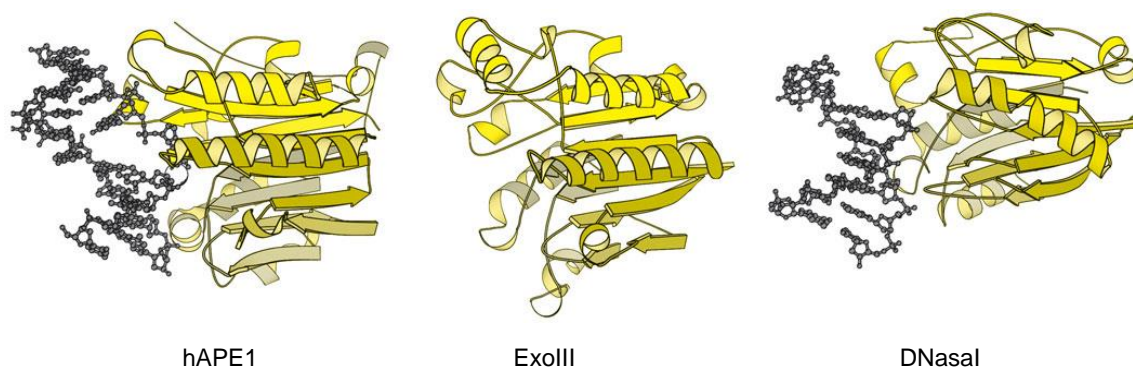


Figura 13. Estructura de hAPE1, ExoIII y la DNaseI. Las tres enzimas son nucleasas dependientes de metal con una estructura similar. Adaptado de Friedberg, 2006.

Familia EndoIV

La actividad AP endonucleasa de EndoIV (también conocida como Nfo) fue descubierta en experimentos con mutantes de *E. coli* deficientes en ExoIII (Ljungquist, 1977; Ljungquist *et al.*, 1976). Además de sitios abásicos, EndoIV tiene como sustratos intermediarios de reparación con extremos 3'-P o 4-hidroxi-2-pental (Doetsch and Cunningham, 1990). Sin embargo, EndoIV carece de la actividad 5'-3' exonucleasa que posee ExoIII.

EndoIV es una proteína de 32 kDa dispuesta en barril- β con ocho láminas en β y ocho α -hélices. Esta estructura fue descrita por primera vez en la triosa fosfato isomerasa (TIM) (Banner *et al.*, 1975), pero fue en EndoIV la primera vez que se observó que esta estructura permitía la unión a macromoléculas como el ADN. Además, fue la primera enzima descubierta con barril TIM que contiene un sitio activo capaz de coordinar zinc (Figura 14).

La capacidad de coordinar zinc permite la activación de la molécula de agua que hidroliza el sitio AP (Garcin *et al.*, 2008; Hosfield *et al.*, 1999), a diferencia de las AP endonucleasas de la familia ExoIII, cuya actividad es dependiente de magnesio. La unión al sitio AP por parte de EndoIV se lleva a cabo a través de cinco bucles con carga positiva que contactan con desoxinucleótidos de ambas cadenas distorsionando la estructura local del ADN (Figura 14) (Mol *et al.*, 2000a).

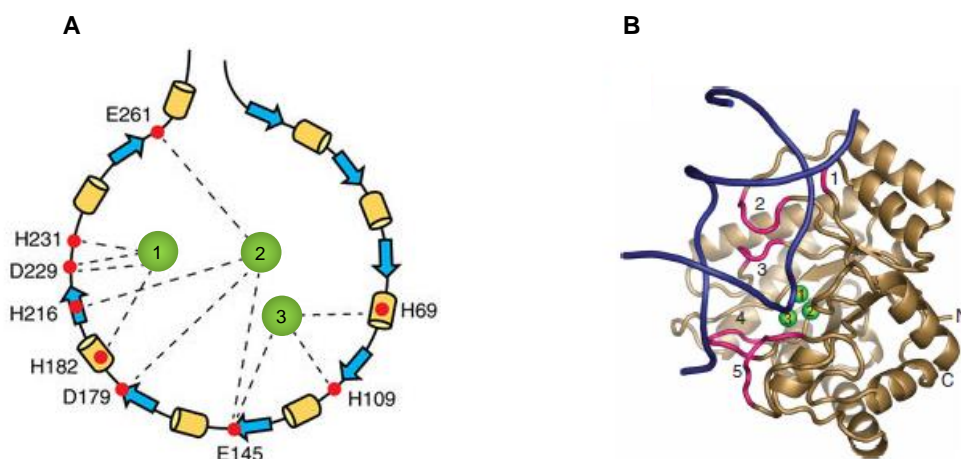


Figura 14. Estructura de EndoIV. (A) Representación bidimensional de EndoIV. La enzima se conforma formando un barril de por ocho α hélices y ocho láminas en β , que le permiten coordinar tres iones de zinc (numerados, esferas verdes) que participan en la hidrólisis del sitio AP. (B) Representación tridimensional de EndoIV. Se muestran cinco bucles (en rosa, formados por los residuos 10-13; 34-38; 70-73; 149-153 y 224-230) que permiten la unión al ADN. Adaptado de Baños-Mateos *et al.*, 2017; Garcin *et al.*, 2008.

5.2. Mecanismo de acción de las AP endonucleasas

La AP endonucleasa humana 1 es la mejor caracterizada entre las AP endonucleasas descritas hasta la fecha. Esta enzima se une al ADN y se desplaza por la molécula hasta localizar el sitio AP. Existen varios residuos de interés en el reconocimiento del ADN por parte de hAPE1: los residuos Met270 y Met271 interaccionan con el surco menor del ADN mientras que el residuo Arg177 interacciona con el surco mayor (Dyrkheeva *et al.*, 2016). Este residuo además se une al grupo fosfato de 3' del sitio AP para estabilizarlo, siendo responsable de la baja tasa de recambio de la enzima (Mol *et al.*, 2000a). Ello impediría la rotura del sitio AP y facilitaría la coordinación con el resto de enzimas participantes en la ruta de reparación.

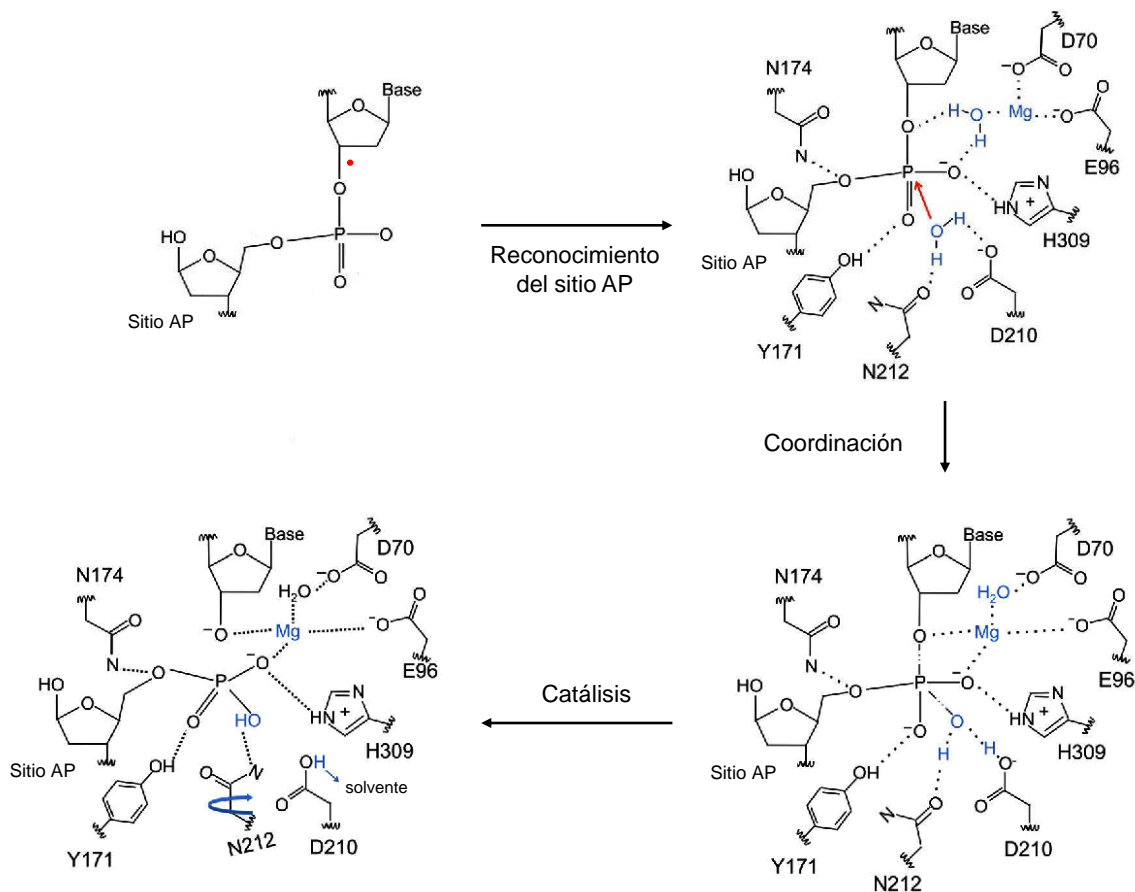


Figura 15. Mecanismo catalítico de hAPE1. En la primera etapa, el sitio AP es reconocido y acomodado en el sitio activo de la enzima. Posteriormente, los residuos de hAPE1 y el magnesio coordinan los átomos del esqueleto azúcar-fosfato donde se producirá la hidrólisis, a través de una molécula de agua activada por parte de hAPE1. Finalmente, se genera un hueco con extremos 3'-OH y 5'-dRP. El residuo N212 rota para permitir un puente de hidrógeno y estabilizar el producto. El punto rojo indica el lugar en el que se produce la hidrólisis del esqueleto azúcar-fosfato, mientras que la flecha roja señala el punto de ataque de la molécula de agua activada. Adaptado de Freudenthal *et al.*, 2015.

El mecanismo catalítico de hAPE1 (Figura 15) (Freudenthal *et al.*, 2015; Mol *et al.*, 2000b) se basa en la capacidad de los residuos Asp210 y Asn212 de activar y coordinar una molécula de agua. En los pasos previos a la catálisis los residuos de His309 y Tyr171 forman puentes de hidrógeno con el fosfato para neutralizar su carga y facilitar el ataque nucleofílico del agua. Por otra parte, un solo ión de magnesio se une a los residuos Asp70, Glu96 y a otra molécula de agua, permitiendo la estabilización de un átomo de oxígeno del extremo 5'-dRP y del extremo 3'-OH. El resto de átomos de oxígeno del grupo fosfato del 5'-dRP sería estabilizado por Tyr171, His309, Asp210 y Asn212. Finalmente, el ión hidróxido activado ataca el sitio AP por el lado 5' del fosfato, generando un hueco flanqueado por un extremo 3'-OH y por un grupo 5'-dRP que será estabilizado por los residuos Asn174, Asp70, Glu96, His309, Tyr171 y Asn212 de la enzima, junto con el ión magnesio.

6. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo para el estudio de BER en plantas

El estudio de la ruta BER en plantas es relativamente reciente, y si bien este mecanismo reparador no se conoce con tanto detalle como en animales o bacterias, se han identificado una gran cantidad de proteínas implicadas y se ha descubierto que no sólo desempeña un papel crucial en la protección del genoma de la planta, sino que además interviene en procesos de reprogramación epigenética (Choi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002; Morales-Ruiz *et al.*, 2006; Ortega-Galisteo *et al.*, 2008). La mayor parte de los avances en el estudio de la ruta BER y de otros mecanismos de reparación de ADN en plantas han sido posibles gracias al empleo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

6.1. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo

Arabidopsis thaliana es una crucífera con una amplia distribución por las regiones templadas de Europa, Asia y Norte de América, aunque también se ha introducido con éxito en Norteamérica y Australia. Su hábitat natural son campos abiertos de suelos arenosos y bordes de caminos. En las poblaciones naturales se han identificado diferentes ecotipos, es decir, poblaciones genéticamente diferenciadas en función de su distribución geográfica. No obstante, sólo dos de ellos (Columbia y Landsberg erecta) se han establecido como ecotipos estándar para estudios genéticos y moleculares (The *Arabidopsis* Genome Initiative., 2000).

Arabidopsis thaliana tiene una serie de características que la convierten en un modelo experimental atractivo, entre las que destacan:

- Tamaño de genoma pequeño. El tamaño del genoma de *Arabidopsis* es sólo 22 veces mayor que el de la bacteria *E. coli* y 10 veces el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La principal razón de su pequeño tamaño, en comparación con el genoma

de otras plantas, es la menor cantidad de espacio intergénico y de secuencias repetitivas: casi el 80% del ADN nuclear codifica proteínas. Además, el genoma de *Arabidopsis* está secuenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative., 2000).

- Ciclo de vida corto (6 a 8 semanas). Asimismo, el crecimiento de la planta no es estacional y se pueden producir varias generaciones en un año, lo que facilita análisis genéticos rápidos.
- Fácil de transformar con *Agrobacterium tumefaciens*.
- Existencia de una colección de mutantes generados por diferentes técnicas de mutagénesis.
- Manejo sencillo en comparación con cultivos celulares de mamíferos (Hays, 2002).
- Cada planta produce más de 5.000 semillas (Meinke *et al.*, 1998), lo que junto a su pequeño tamaño, la convierten en un organismo ideal para experimentos de mutagénesis.
- Se autofecunda, permitiendo el mantenimiento de líneas homocigóticas. Además, es fácil la realización de cruces dirigidos.
- Conservación de mecanismos de mantenimiento del genoma con otros organismos eucarióticos (Hays, 2002).
- Viabilidad de mutantes deficientes en enzimas de reparación para las que una insuficiencia es letal en otros organismos (Hays, 2002).

6.2. Estudio de las funciones de mantenimiento de la estabilidad del genoma en *Arabidopsis*

Históricamente, el análisis genético y bioquímico de la estabilidad del genoma y las respuestas celulares al daño en el ADN se ha centrado en tres grupos modelo, filogenéticamente diversos: bacterias, levaduras y animales. El conocimiento de estos mecanismos en otros organismos, como las plantas, es, en comparación, mucho menor.

El estudio del mantenimiento del genoma en plantas se basa en dos aspectos fundamentales (Hays, 2002). En primer lugar, las plantas carecen de una línea germinal. Los gametos se forman a partir de células meristemáticas indiferenciadas, normalmente tras completarse el ciclo de vida de la planta. Además, los gametos son el producto de varias generaciones de crecimiento somático con exposición continua a mutágenos endógenos y exógenos, lo que se traduce en múltiples oportunidades de error en la replicación (Hays, 2002).

En segundo lugar, la rigidez de la pared celular de los tejidos vegetales impide el desarrollo de análogos de los tumores metastásicos que se forman en las células de mamífero. Así, las plantas no requieren determinados puntos de control celular, ni respuestas de apoptosis. De

hecho, se ha propuesto que las plantas pueden tolerar algunas deficiencias en el mantenimiento del genoma que en mamíferos provocarían respuestas apoptóticas letales.

Así pues, es posible que, por una parte, algunas actividades destinadas a mantener el genoma sean más intensas en plantas que en otros organismos, y por otra, que el análisis genético detallado de las respuestas celulares eucarióticas al daño en el ADN sea más sencillo de realizar en plantas que en animales (Hays, 2002).

6.3. La ruta BER en *Arabidopsis thaliana*

En *Arabidopsis* se han identificado proteínas que participan en diversas etapas de la ruta BER (Figura 16) (Britt, 2002; Cordoba-Cañero *et al.*, 2011; Córdoba-Cañero *et al.*, 2014; Hays, 2002; Roldan-Arjona and Ariza, 2009). Entre las ADN glicosilasas que inician la ruta, la principal encargada de eliminar uracilo es la ADN glicosilasa monofuncional UNG (Córdoba-Cañero *et al.*, 2010). *Arabidopsis* también posee una proteína del tipo MBD4 (*Methyl-CpG-binding domain protein 4*, MBD4L), activa frente a apareamientos incorrectos U:G y T:G, pero, a diferencia de su homólogo en mamíferos, MBD4L carece del dominio de unión metil-CpG (Ramiro-Merina *et al.*, 2013).

El genoma de *Arabidopsis* codifica también para varias ADN glicosilasas capaces de escindir bases alquiladas, aunque, hasta la fecha, sólo se ha caracterizado la ADN glicosilasa AthAAG, que escinde N3-meA (Santerre and Britt, 1994).

Arabidopsis posee también varias ADN glicosilasas para reparar bases oxidadas. Las pirimidinas oxidadas, tales como el timinglicol, son reconocidas por la ADN glicosilasa bifuncional NTH1. Esta enzima es capaz de actuar como AP liasa sobre sustratos de ADN irradiados con luz UV y rayos γ (Roldán-Arjona *et al.*, 2000). La reparación de purinas oxidadas, como la 8-oxoG, se lleva a cabo por ADN glicosilasas de dos superfamilias estructurales diferentes: OGG1 (de la familia HhH-GPD) y FPG (de la familia H2TH) (Córdoba-Cañero *et al.*, 2014). En un principio se creyó que las enzimas tipo FPG se encontraban exclusivamente en bacterias y las relacionadas con OGG1 únicamente en eucariotas y arqueas, hasta que se descubrió que *Arabidopsis* cuenta con sendos homólogos estructurales y funcionales de ambos tipos de ADN glicosilasas (Dany and Tissier, 2001; Garcia-Ortiz *et al.*, 2001; Ohtsubo *et al.*, 1998). Experimentos con proteínas recombinantes han demostrado que OGG1 reconoce 8-oxoG (Garcia-Ortiz *et al.*, 2001), mientras que FPG es más activa reconociendo sitios AP (Kathe *et al.*, 2009). Esto apoya la hipótesis de que las plantas han retenido ambas clases de enzimas por su distinta especificidad sobre diferentes sustratos (Morales-Ruiz *et al.*, 2003).

Uno de los descubrimientos más relevantes en *Arabidopsis* ha sido la identificación de ADN glicosilasas que eliminan 5-meC una modificación epigenética derivada de la citosina y que

no constituye una lesión. Estas enzimas, específicas de plantas, pertenecen a la superfamilia de ADN glicosilasas HhH-GPD y constituyen la familia denominada DML (*DEMETER-LIKE*), cuyos miembros fundadores son las enzimas DME (*DEMETER*) y ROS1 (*REPRESSOR OF SILENCING 1*). Actúan como desmetilasas, iniciando una ruta BER que elimina 5-meC y la sustituye por citosina no metilada (Choi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002; Morales-Ruiz *et al.*, 2006; Ortega-Galisteo *et al.*, 2008).

La escisión de la base por parte de una ADN glicosilasa genera un sitio abásico que puede ser procesado por AP endonucleasas o AP liasas. La principal AP endonucleasa detectable en extractos celulares de *Arabidopsis* es ARP (*Apurinic endonuclease redox protein*) (Córdoba-Cañero *et al.*, 2011), perteneciente a la familia ExoIII. Al igual que en otros organismos, la actividad AP liasa está asociada a ADN glicosilasas bifuncionales que generan huecos con extremos bloqueantes 3'-PUA o 3'-P. Los primeros son procesados por la actividad 3'-fosfodiesterasa de la AP endonucleasa APE1L (*AP endonuclease 1 like*) (Li *et al.*, 2015), y los segundos por la ADN 3'-fosfatasa ZDP (*zinc finger DNA 3' phosphoesterase*) (Córdoba-Cañero *et al.*, 2014).

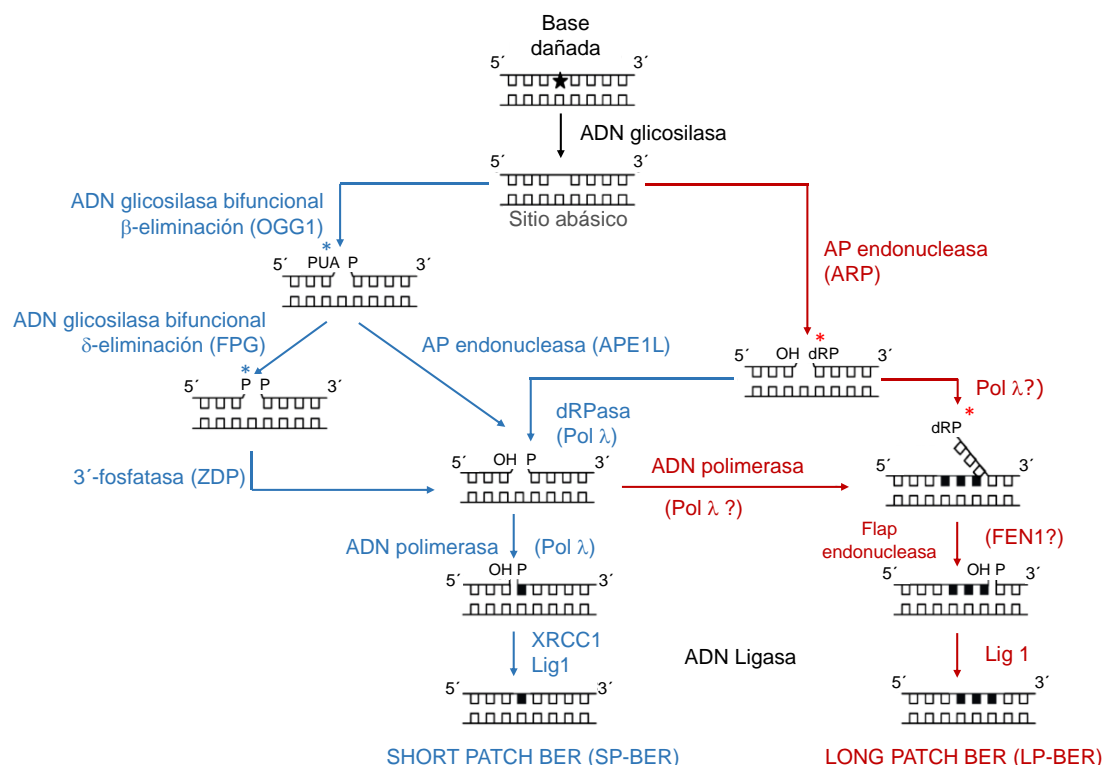


Figura 16. Esquema de la ruta de reparación por escisión de bases en *Arabidopsis*. En *Arabidopsis* se han identificado varias enzimas implicadas en la ruta BER. Con asterisco se marcan los extremos de los intermediarios de reacción que impiden la polimerización y la ligación del hueco. Modificado a partir de Baute and Depicker, 2008.

En *Arabidopsis* se ha identificado también a un homólogo de la proteína de andamiaje XRCC1, que participa en varias etapas del proceso de BER (Martínez-Macias *et al.*, 2013). Para restablecer la secuencia original del ADN y completar la reparación es necesaria la actuación de un sistema de ADN polimerasas y ligasas. El conocimiento las etapas finales de la ruta BER en plantas es bastante menor que el existente en otros organismos.

En células humanas, la reparación mediante la inserción de un desoxinucleótido (SP-BER) se lleva a cabo mediante la ADN polimerasa β de la familia X y las ADN ligasas I y III (Kubota *et al.*, 1996). Las plantas no poseen homólogos de Pol β pero sí disponen de Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2000), otro miembro de la familia X (Uchiyama *et al.*, 2009), aunque por ahora no hay evidencias de que desempeñe un papel en BER. Por otra parte, tampoco se han identificado homólogos vegetales de la Ligasa III. Aunque inicialmente se propuso que en plantas la ruta BER sólo podía culminar mediante inserción de varios desoxinucleótidos (LP-BER) (Uchiyama *et al.*, 2009) se ha demostrado que extractos celulares de *Arabidopsis* catalizan reacciones de reparación tanto vía SP- como LP-BER (Córdoba-Cañero *et al.*, 2009), y que en ambos casos el paso final es llevado a cabo por la ADN ligasa I (Córdoba-Cañero *et al.*, 2011).

6.3.1. AP endonucleasas de *Arabidopsis*

En *Arabidopsis* no existen homólogos estructurales de EndoIV. Las tres AP endonucleasas de *Arabidopsis* están relacionadas estructuralmente con ExoIII y son dependientes de magnesio (Figura 17).

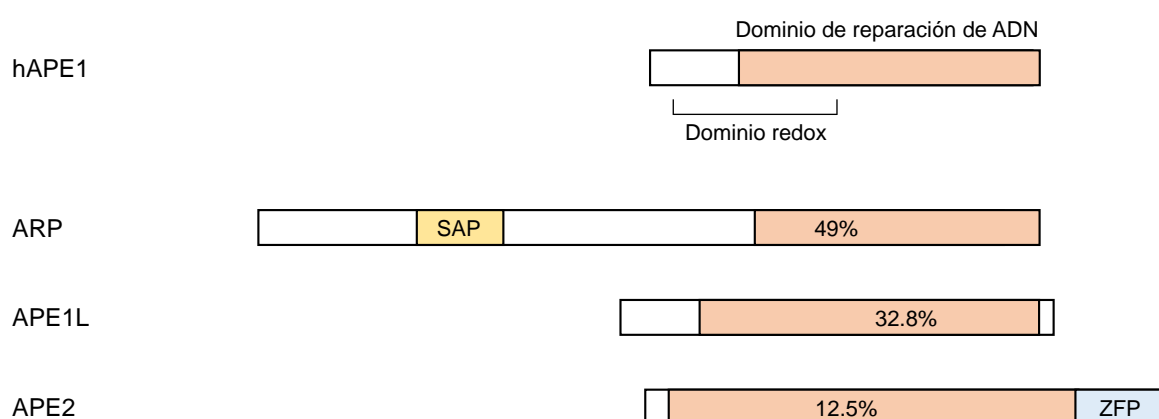


Figura 17. Diagrama esquemático de los dominios funcionales de hAPE1 y las AP endonucleasas de *Arabidopsis*. Se indica el porcentaje de residuos similares a los de hAPE1. El dominio redox de hAPE1 comparte residuos con el dominio de reparación de ADN. SAP: dominio de unión al ADN; ZFP: dedo de zinc.

ARP

ARP fue la primera de las tres AP endonucleasas de *Arabidopsis* en ser caracterizada (Babiychuk *et al.*, 1994a). La primera actividad enzimática que se identificó en ARP no se relacionó con procesos de reparación, sino con la activación heteróloga de factores de transcripción humanos Fos/Jun en función del estado redox de la propia AP endonucleasa (Babiychuk *et al.*, 1994a). Aunque dicha activación mimetiza la llevada a cabo hAPE1, la relevancia biológica de la función redox de ARP es desconocida, ya que no existen homólogos de los factores Fos/Jun en *Arabidopsis*.

No obstante, el papel reparador de esta proteína está fuera de duda. ARP es la principal AP endonucleasa detectable en extractos celulares de *Arabidopsis* con capacidad para procesar sitios abásicos sintéticos y los generados tras la escisión de uracilo (Cordoba-Cañero *et al.*, 2011). Las plantas mutantes deficientes en ARP crecen con normalidad, pero son hipersensibles al 5-fluorouracilo, un compuesto que favorece la incorporación errónea de uracilo al ADN (Cordoba-Cañero *et al.*, 2011). También se ha descrito el papel de ARP en la reparación de la lesión 8-oxoG (Córdoba-Cañero *et al.*, 2014), posiblemente procesando el intermediario 3'-PUA generado por la actividad AP liasa de OGG1 o directamente reemplazando dicha actividad.

El conocimiento existente de la estructura de ARP no es comparable al de AP endonucleasas de otros organismos. La actividad enzimática de ARP reside en el extremo carboxilo que contiene la región EEP (exonucleasa, endonucleasa y fosfatasa) de la proteína y presenta alta homología con ExoIII y hAPE1. El extremo amino terminal presenta un dominio SAP, que permite la unión al ADN. Como todas las AP endonucleasas de la familia ExoIII, ARP es dependiente de Mg^{2+} , aunque también otros cationes divalentes como el manganeso o el cobalto son capaces de permitir su actividad catalítica (Lee *et al.*, 2014).

APE1L

La segunda AP endonucleasa de *Arabidopsis* mejor caracterizada es APE1L. Esta enzima tiene la secuencia de aminoácidos más corta de las tres AP endonucleasas descritas en *Arabidopsis*, presentando un dominio catalítico con alta homología a hAPE1.

APE1L presenta una limitada actividad sobre sitios abásicos pero es clave en la ruta de desmetilación activa vía BER, ya que procesa intermediarios con extremos 3'-PUA generados tras la escisión de 5-metilcitosina por parte de las ADN glicosilasas DME y ROS1 (Li *et al.*, 2015).

APE2

APE2, la AP endonucleasa menos estudiada de *Arabidopsis*, es una proteína de 408 aminoácidos que se expresa en tejidos vegetativos y reproductivos. Presenta un dominio EEP cercano a su extremo amino terminal y tiene un alto grado de similitud de secuencia con la AP endonucleasa 2 humana. APE2 posee actividad AP endonucleasa (Li et al., 2015), pero hasta la fecha, no se ha descrito actividad relevante de esta enzima frente a ningún otro tipo de sustrato. No obstante, se requiere al menos una copia intacta de APE1L o APE2 para el correcto desarrollo del embrión (Murphy et al., 2009).

6.3.2. La ADN glicosilasa FPG de *Arabidopsis*

La ADN glicosilasa FPG en *Arabidopsis* (FPG) es una proteína ortóloga a la enzima Fpg de *E. coli* (Ohtsubo et al., 1998). Ambas pertenecen a la superfamilia de ADN glicosilasas H2TH y son bifuncionales, es decir poseen actividad ADN glicosilasa y AP liasa.

FPG está codificada por un gen de una sola copia en el cromosoma 1, que comprende una región aproximada de 3 kb. El gen *FPG* presenta 10 exones, y se ha descrito la existencia de siete variantes de ARNm que pueden producirse por procesamiento alternativo del ARN transcrito (Murphy and Gao, 2001), generando presumiblemente diferentes isoformas de la proteína, de las cuales sólo una ha sido caracterizada en detalle (Duclos et al., 2012; Kathe et al., 2009).

El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de la isoforma 1 de FPG de *Arabidopsis* revela la presencia de una versión muy corta del bucle α -F- β 9/10. Este bucle, presente en Fpg de *E. coli*, se encarga de acomodar la 8-oxoG, permitiendo su escisión. Esta diferencia parece explicar la inactividad de FPG sobre 8-oxoG (Duclos et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que se requiere una copia intacta del gen *FPG* para la reparación de 8-oxoG catalizada por extractos celulares de *Arabidopsis* (Córdoba-Cañero et al., 2014). Esta actividad reparadora presumiblemente proviene de otra de las isoformas de la enzima generadas por procesamiento alternativo del transcrito.

FPG también reconoce otros sustratos como guanidinohidantoína y espiroiminohidantoína (Duclos et al., 2012). Además, se ha demostrado que FPG escinde lesiones como 5-hidroxi-5-metilhidantoína, 8-oxodenina, FAPy-G y FAPy-A generadas en ADN tratado con rayos γ (Kathe et al., 2009). Además, su actividad AP liasa ha sido demostrada mediante experimentos con oligonucleótidos con sitios abásicos en una posición definida (Kathe et al., 2009). FPG, al igual que su ortólogo bacteriano, genera intermediarios con extremos 3'-P a través de una reacción de β , δ -eliminación.

6.3.1. La ADN 3'-fosfatasa ZDP de *Arabidopsis*

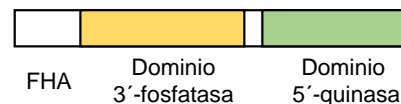
La ADN 3' fosfatasa ZDP desempeña un papel crucial en el procesamiento de intermediarios de reparación con extremos 3'-P generados en la ruta BER. ZDP es una proteína homóloga a ZmDP2 de *Zea mays*, que fue la primera enzima de plantas identificada con actividad hidrolítica sobre extremos 3'-P del ADN. ZmDP2 y ZDP presentan homología con la proteína de mamíferos PNKP (*polynucleotide kinase 3'-phosphatase*) (Figura 18), aunque ambas carecen de la actividad 5'quinasa que sí presenta PNKP (Betti *et al.*, 2001).

ZDP es una proteína con un extremo C-terminal con actividad ADN 3'-fosfatasa y un dominio N-terminal de unión al ADN, que contiene tres dedos de zinc. La enzima se une a roturas de cadena doble y simple, desfosforilando el extremo 3'-P de los intermediarios de reparación para generar el correspondiente 3'-OH (Petrucchio *et al.*, 2002).

ZDP es la principal, y probablemente la única, ADN 3'-fosfatasa en *Arabidopsis*. Se ha demostrado que una de sus funciones es procesar los extremos 3'-P de los productos generados mediante β , δ -eliminación por la ADN glicosilasa bifuncional ROS1 (Figura 19).

ZDP interacciona con ROS1 y fomenta la disociación de su producto, liberándola para sucesivos ciclos catalíticos (Martinez-Macias *et al.*, 2012).

Mus musculus PNKP



Arabidopsis thaliana ZDP

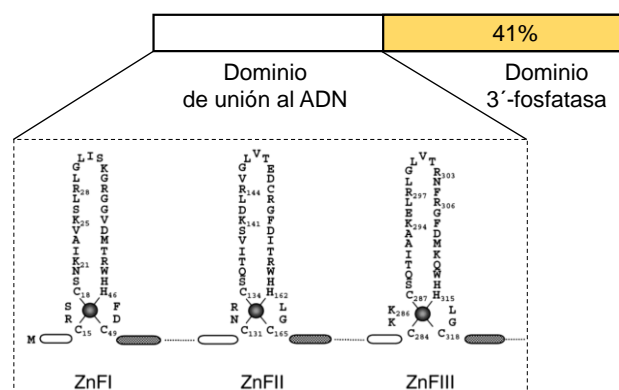


Figura 18. Representación esquemática de la estructura de PNKP y ZDP. PNKP y ZDP conservan el dominio 3'-fosfatasa. Sin embargo, ZDP carece del dominio 5'-quinasa, presente en PNKP. El dominio FHA (*forkhead-associated*) de PNKP le permite unirse a XRCC1 en las SSB y DSB (Koch *et al.*, 2004). El porcentaje indica el grado de identidad entre los dominios 3'-fosfatasa entre PNKP y ZDP. Adaptado de Petrucchio *et al.*, 2002.

También se ha descrito que ZDP es responsable del procesamiento de intermediarios con extremo 3'-P durante la reparación de 8-oxoG (Córdoba-Cañero *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que las plantas deficientes en ZDP son hipersensibles al agente alquilante MMS (Martínez-Macias *et al.*, 2012). Esto sugiere que durante la reparación de lesiones causadas por MMS se generan intermediarios con extremos 3'-P.

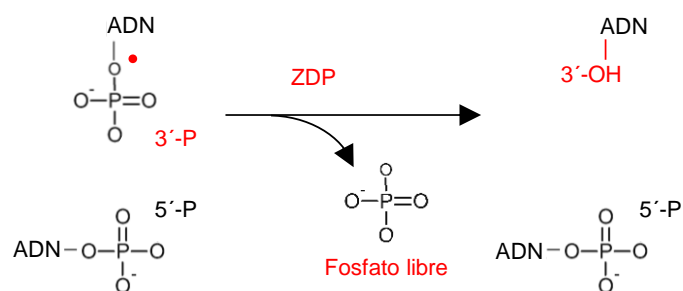


Figura 19. Actividad ADN 3'-fosfatasa de ZDP. ZDP es la principal ADN 3'-fosfatasa de *Arabidopsis* y se encarga de desfosforilar extremos 3'-P de intermediarios de reparación a 3'-OH.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral parte de la observación de que plantas de *Arabidopsis* deficientes en la ADN 3'-fosfatasa ZDP son sensibles a metil metanosulfonato (MMS). Esta sensibilidad surge probablemente de la acumulación de extremos bloqueados 3'-P durante la reparación de las lesiones inducidas por este agente alquilante. Puesto que la lesión más frecuente inducida por el MMS es la N7-meG, se planteó la hipótesis de que durante la reparación de N7-meG o alguno de sus derivados se generan intermediarios con extremos 3'-P por acción de una ADN glicosilasa/AP liasa que cataliza una reacción de β , δ -eliminación. Por tanto, la hipótesis predice que las AP endonucleasas probablemente desempeñen un papel secundario en la reparación de daños inducidos por MMS en el genoma de *Arabidopsis*.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido dilucidar la base molecular de los principales mecanismos de defensa de *Arabidopsis thaliana* frente a los efectos genotóxicos del metil metanosulfonato, empleando para ello abordajes genéticos y bioquímicos.

Se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Optimizar un ensayo para mimetizar *in vitro* la reparación de N7-meG y sus derivados.
2. Detectar los distintos tipos de intermediarios generados en el ADN durante dicha reparación.
3. Identificar las principales proteínas implicadas en el proceso reparador.

Resultados

1. Síntesis y caracterización de los sustratos de ADN

Para analizar el papel de ZDP en la reparación de daños generados por MMS se ha empleado N7-meG como lesión modelo, ya que es el daño más frecuente inducido por este agente alquilante (Beranek, 1990) (Introducción, apartado 2). Para mimetizar *in vitro* la reparación de esta lesión se sintetizó un sustrato bicatenario de ADN con un residuo de N7-meG en una posición definida. Para ello se empleó un heterodúplex formado por un oligonucleótido de 28 residuos marcado con fluoresceína en su extremo 5', que actúa como cebador, y un oligonucleótido de 51 residuos que actúa como cadena molde. La porción monocatenaria de dicho heterodúplex solo contiene una citosina, situada frente a la posición 29 de la cadena a sintetizar. A continuación, el heterodúplex se extendió con el fragmento Klenow (3'-5' exo⁻) de la ADN polimerasa I de *E. coli*, en presencia de dATP, dCTP, dTTP y N7-metil-dGTP, obteniéndose un homodúplex que contiene un único residuo de N7-metil-dGMP en la posición 29. Como control se sintetizó un sustrato con una guanina no modificada en la posición 29 (Figura 20). Una vez obtenido el sustrato de ADN con N7-meG (en adelante N7-meG:C), se llevó a cabo su conversión a me-FAPy-G mediante incubación en un tampón alcalino, que fomenta la apertura del anillo de imidazol (Figura 20).

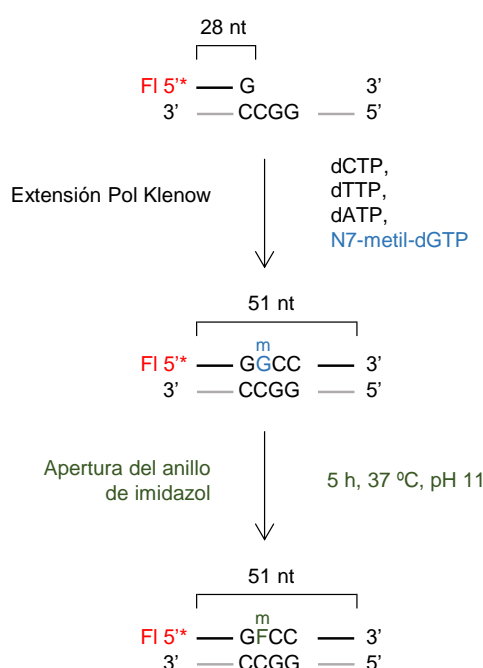


Figura 20. Esquema de la síntesis de un sustrato con N7-meG en una posición definida y su conversión a me-FAPy-G. Un oligonucleótido de 28 residuos marcado con fluoresceína (FI) en su extremo 5' se hibridó a uno de 51 residuos y se extendió por el fragmento Klenow (3'-5' exo⁻) de la ADN polimerasa I de *E. coli* en presencia de dATP, dCTP, dTTP y N7-metil-dGTP durante 1 h a 37 °C. El residuo de N7-meG (mG) se convirtió a su forma abierta me-FAPy-G (mF) mediante incubación en un tampón alcalino durante 5 h a 37 °C.

Para confirmar la presencia de los residuos N7-meG o me-FAPy-G en los sustratos sintetizados se realizaron ensayos de incisión con ADN glicosilasas que reconocen específicamente cada una de estas dos lesiones. En este tipo de ensayos la actividad ADN glicosilasa se detecta como consecuencia de la escisión de la base alterada y la posterior incisión en la cadena marcada. Los productos de reacción se separan en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y la actividad ADN glicosilasa se determina como la cantidad de oligonucleótido procesado (Figura 21A). Para la verificación del sustrato N7-meG:C se empleó la ADN glicosilasa hAAG, que escinde N7-meG pero no me-FAPy-G ni guanina (O'Brien and Ellenberger, 2004). La incisión posterior del sitio AP generado se realizó mediante incubación con hAPE1. Por otra parte, el residuo me-FAPy-G se detectó con la ADN glicosilasa bifuncional Fpg de *E. coli* (de ahora en adelante EcoFpg), que reconoce me-FAPy-G pero no N7-meG ni guanina (Boiteux *et al.*, 1990).

Los resultados muestran que el sustrato N7-meG:C fue totalmente procesado por hAAG y hAPE1 (Figura 21B, carril 7), mientras que no se detectó producto de reacción en presencia de EcoFpg (Figura 21B, carril 8). Por su parte, el sustrato me-FAPy-G:C fue totalmente procesado por EcoFpg (Figura 21B, carril 12), mientras que no se detectó producto de reacción en presencia de hAAG y hAPE1 (Figura 21B, carril 11). Como era de esperar, la actividad de hAAG y hAPE1 generó extremos 3'-OH mientras que EcoFpg produjo extremos 3'-P.

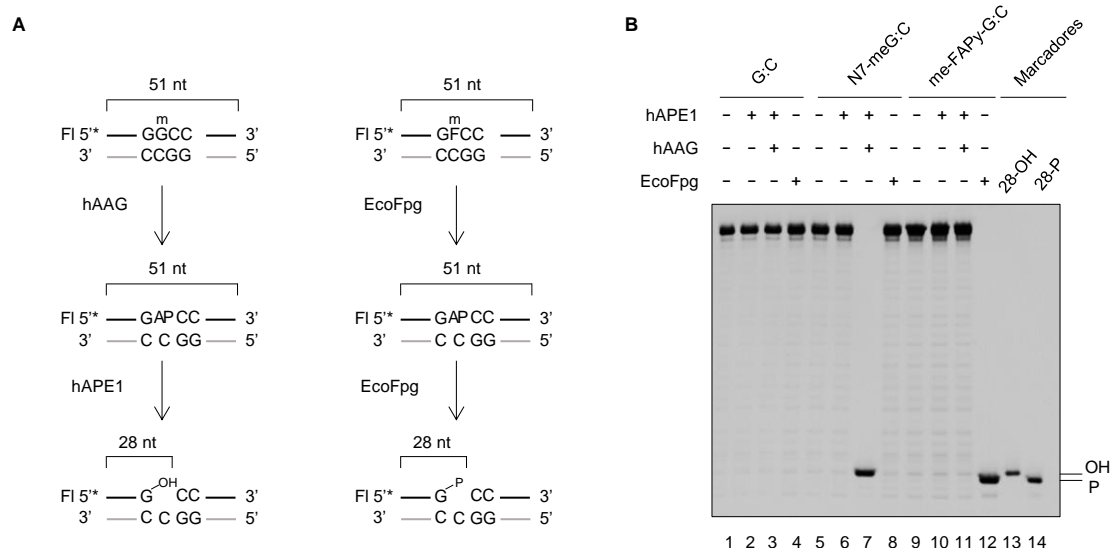


Figura 21. Caracterización de los sustratos de ADN N7-meG:C y me-FAPy-G:C. A) Diagrama esquemático de los sustratos empleados en el ensayo de incisión y del producto generado por la actividad ADN glicosilasa y la posterior incisión del sitio AP. FI, fluoresceína. B) Caracterización de los sustratos mediante ensayo de incisión con ADN glicosilasas específicas de N7-meG y me-FAPy-G. Los sustratos bicatenarios (20 nM) se incubaron a 37 °C durante 8 h con distintas combinaciones de hAPE1 (1 U), hAAG (2 U) y/o EcoFpg (8 U), tal y como se indica. Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12 % y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia.

El sustrato control G:C no fue procesado por ninguna de las enzimas utilizadas (Figura 21B, carriles 2-4). Estos resultados demuestran que los sustratos de ADN sintetizados poseen las lesiones de interés en la posición correcta.

2. La ADN 3'-fosfatasa ZDP participa en la ruta de reparación de ADN con N7-meG

Una vez optimizada la síntesis de los sustratos, se analizó la capacidad de los mutantes *zdp*^{-/-} para reparar ADN con N7-meG. En primer lugar, se incubaron extractos celulares de plantas silvestres o mutantes *zdp*^{-/-} durante 16 horas con el sustrato de ADN que contiene N7-meG:C, posteriormente, la incubación se prolongó durante una hora más en presencia de magnesio para permitir la actividad de ZDP (Figura 22).

Las reacciones catalizadas por extractos celulares de plantas silvestres generaron intermediarios de reparación con extremos 3'-OH (Figura 22, carril 2). Por el contrario, las reacciones catalizadas por extractos celulares de plantas *zdp*^{-/-} acumularon intermediarios de reparación con extremos 3'-P (Figura 22, carril 3). Dichos extremos fueron convertidos a 3'-OH cuando a la reacción se añadió proteína recombinante ZDP (Figura 22, carril 4).

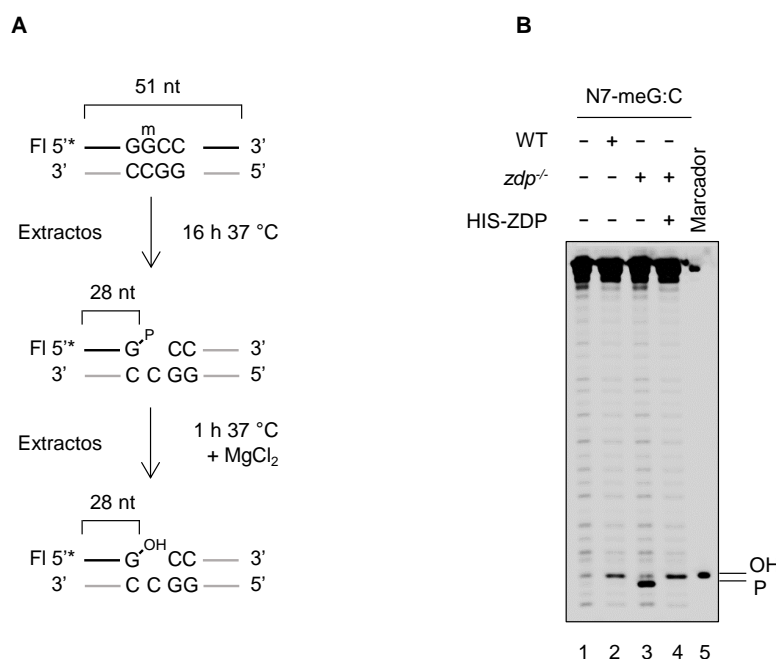


Figura 22. ZDP procesa intermediarios de reparación con extremos 3'-P generados durante la reparación de ADN con N7-meG. A) Diagrama esquemático del sustrato y del producto de reacción en el ensayo de incisión. mG, N7-meG; FI, fluoresceína. B) Ensayo de incisión de extractos sobre ADN que contiene N7-meG. Se incubaron extractos celulares de plantas silvestres (WT) o mutantes *zdp*^{-/-} (13 µg) a 37 °C durante 16 h con el sustrato N7-meG:C (20 nM). Posteriormente, se prolongó la incubación durante 1 h más, previa adición de MgCl₂ (2 mM) a todas las reacciones y de proteína recombinante His-ZDP (1,8 nM) a la reacción en el carril 4. Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia.

Estos resultados sugieren que durante la reparación de ADN con N7-meG se generan productos intermediarios con extremos bloqueados 3'-P que han de ser procesados por la actividad ADN 3'-fosfatasa de ZDP.

3. ZDP actúa tras FPG en la ruta de reparación de ADN con N7-meG

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la ADN glicosilasa liasa FPG y la ADN 3'-fosfatasa ZDP intervienen en pasos consecutivos de la reparación de 8-oxoG (Córdoba-Cañero *et al.*, 2014). Además, FPG cataliza el procesamiento del sitio AP mediante una reacción de β , δ -eliminación (Introducción, apartados 4.2 y 6.3.2), generando un hueco mono-nucleotídico con un extremo 3'-P, lo que la convierte en una firme candidata para generar los intermediarios de reparación con extremos 3'-P detectados durante la reparación de ADN con N7-meG.

Para contrastar esta hipótesis se identificó en primer lugar una línea mutante de *A. thaliana* (SALK_076932, <http://signal.SALK.edu/about.html>) con una inserción de ADN-T en el primer exón del gen *FPG* (AT1G52500) (Figura 23A). Posteriormente, se sembraron semillas de una población segregante para esta mutación y se asignó genotipo a las plantas mediante PCR con dos cebadores que flanquean el punto de inserción (F1 y F5) y un cebador correspondiente al borde izquierdo del ADN-T (Lba1) (Figura 23A). De este modo se identificaron plantas *fpg*^{+/+}, con un fragmento amplificado de 890 pb correspondiente al alelo silvestre, *fpg*^{-/-}, con un amplicón de 751 pb correspondiente al alelo mutante, y *fpg*^{+/-} con ambos amplicones (Figura 23B). A continuación, se realizaron ensayos de incisión con extractos celulares de plantas silvestres y mutantes *zdp*^{-/-} o *fpg*^{-/-} sobre ADN con N7-meG o me-Fapy-G (Figura 24A).

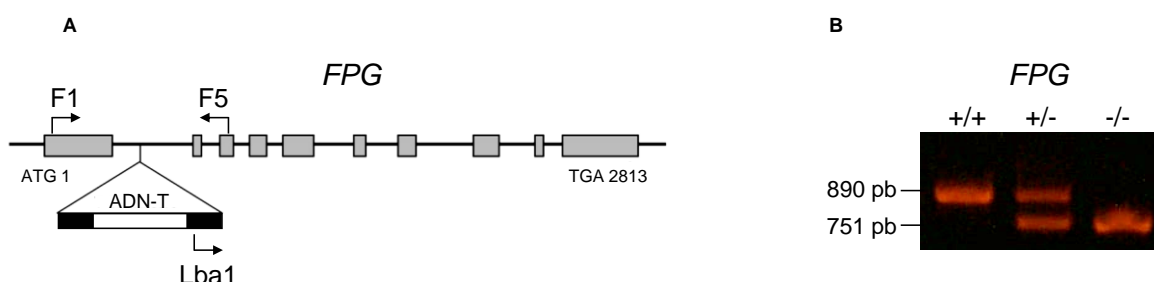


Figura 23. Identificación de plantas mutantes *fpg*^{-/-}. A) Esquema del punto de inserción del ADN-T en el gen *FPG* (línea SALK_076932). Se muestran los exones (cuadros grises) y la posición de los cebadores usados para asignar el genotipo mediante PCR. B) Asignación de genotipo mediante PCR a plantas de la línea SALK_076932 en una población segregante para el alelo mutante. Los tamaños esperados de la amplificación del alelo silvestre y del alelo mutante se indican a la izquierda del gel.

De acuerdo con los resultados descritos previamente (Figura 22), las reacciones catalizadas por extractos de plantas silvestres acumularon intermediarios de reparación con extremos 3'-P en ausencia de magnesio, un catión necesario para la actividad fosfatasa de ZDP (Figura 24B carriles 2 y 3). En presencia de magnesio, dichos extremos fueron procesados a 3'-OH por extractos silvestres (Figura 24B carril 6), pero no por extractos mutantes *zdp*^{-/-} (Figura 24B carril 7).

Sin embargo, los extractos de plantas mutantes *fpg*^{-/-} no generaron ningún intermediario de reparación, ni en ausencia ni en presencia de magnesio (Figura 24B carriles 4 y 8). Estos resultados sugieren que FPG actúa con anterioridad a ZDP durante la reparación de ADN que contiene N7-meG. Durante el proceso reparador, FPG cataliza una reacción de β , δ -eliminación y genera como intermediario un hueco mono-nucleotídico con un extremo 3'-P, que es posteriormente procesado a 3'-OH mediante la actividad ADN 3'-fosfatasa de ZDP.

Para determinar si FPG y ZDP están implicadas en la reparación de otras lesiones inducidas por MMS, se llevaron a cabo reacciones de incisión análogas con un sustrato de ADN que

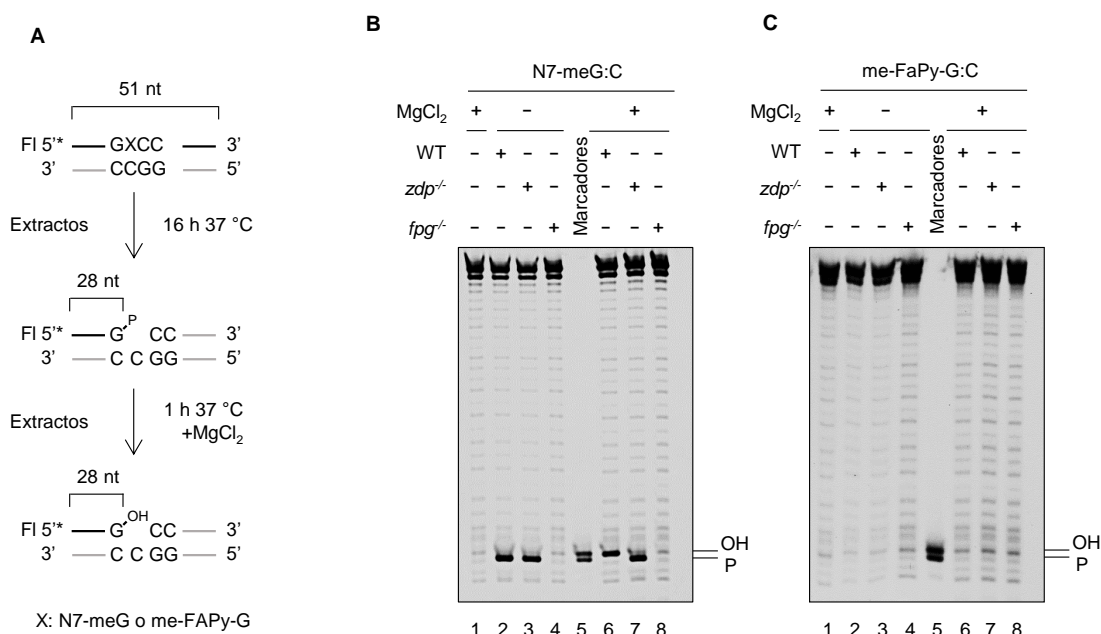


Figura 24. ZDP actúa tras FPG durante la reparación de ADN con N7-meG. A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión y de los productos de reacción. Fl, fluoresceína. B-C) Ensayo de incisión. Los sustratos de ADN (20 nM), N7-meG:C (B) o me-FaPy-G:C (C), se incubaron en presencia de extractos celulares (8 µg) procedentes de plantas silvestres (WT), o de mutantes *zdp*^{-/-} o *fpg*^{-/-}, durante 16 h a 37 °C. Posteriormente se añadió MgCl₂ (2 mM) a las reacciones indicadas y se prolongó la incubación durante 1 h más. Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliácridamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia.

contenía me-FAPy-G (Figura 24C). En este caso no se detectaron niveles significativos de intermediarios de reparación, independientemente del genotipo de las plantas o de la presencia o ausencia de magnesio. Estos resultados indican que FPG y ZDP actúan de forma específica en la reparación de ADN con N7-meG.

4. ZDP y FPG interaccionan *in vitro*

La participación en una misma ruta de reparación de diversas enzimas implica a menudo su interacción física. Así, ZDP interacciona con otras proteínas de la ruta de desmetilación activa del ADN en *Arabidopsis*, como la ADN glicosilasa ROS1 (Martinez-Macias *et al.*, 2012) o la proteína de andamiaje XRCC1 (Martinez-Macias *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de que se ha descrito la intervención de ZDP y FPG en la ruta de reparación de 8-oxoG (Córdoba-Cañero *et al.*, 2014), no hay datos disponibles sobre su posible interacción. Para determinar si ZDP y FPG interaccionan *in vitro*, se realizaron ensayos *pull-down*. En estos ensayos, una de las proteínas es fijada a una matriz de afinidad y actúa como *cebo*. A continuación, se analiza su capacidad para retener de forma específica una segunda proteína que actúa como *presa*, y que es detectada mediante análisis western con un anticuerpo específico (Figura 25A).

En primer lugar, los ensayos *pull-down* se realizaron empleando la proteína ZDP como *cebo* fusionada a MBP (*Maltose Binding Protein*, proteína de unión a maltosa) (Figura 25B). La proteína MBP-ZDP se unió a una matriz de amilosa y se analizó su capacidad para retener de forma específica a FPG fusionada a una cola de histidinas (His-FPG). Además, para descartar interacciones inespecíficas de His-FPG con MBP, se usó la proteína MBP unida a una matriz de amilosa. Los resultados obtenidos indican que His-FPG queda retenida de forma específica en la matriz que contiene MBP-ZDP (Figura 25B, carril 4), pero no en la que contiene MBP (Figura 25B, carril 3), ni en la que no contiene ninguna proteína (Figura 25B, carril 2).

A continuación, se realizaron ensayos *pull-down* usando como *cebo* la proteína His-FPG y como *presa* la proteína MBP-ZDP (Figura 25C). En este caso, se fijó His-FPG a una matriz de Ni²⁺-sefarosa y se analizó su capacidad para retener de forma específica MBP-ZDP. Los resultados obtenidos indican que MBP-ZDP (Figura 25C, carril 3), pero no MBP (Figura 25C, carril 6), queda retenida específicamente en la matriz que contiene His-FPG. Esta retención no tuvo lugar cuando la matriz no contenía ninguna proteína (Figura 25C, carriles 2 y 5), lo que descarta interacciones inespecíficas entre ZDP y la Ni²⁺-sefarosa. En conjunto, estos resultados indican que ZDP y FPG interaccionan de forma específica *in vitro*.

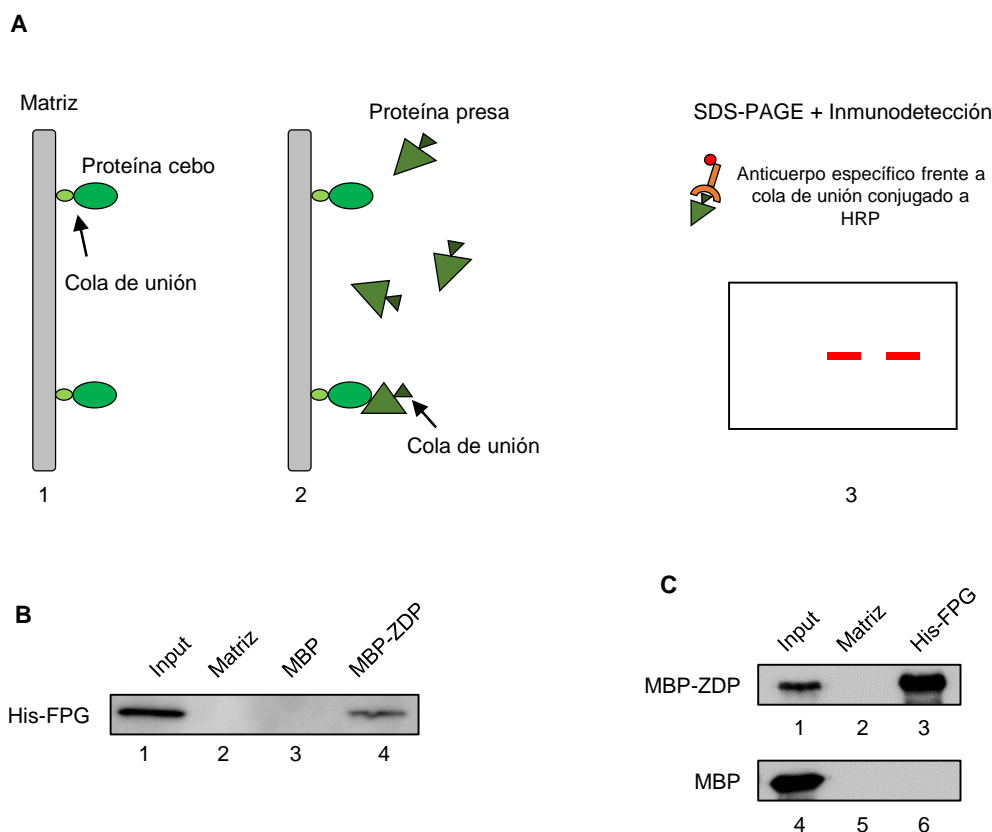


Figura 25. ZDP y FPG interactúan *in vitro*. A) Diagrama de un ensayo *pull-down*. (1) Unión de la proteína cebo a la matriz correspondiente (Ni^{2+} -sefarosa o amilosa) mediante la cola de unión apropiada (His o MBP, respectivamente). (2) Incubación con la proteína presa. (3) Detección con anticuerpos específicos de la proteína presa mediante *western-blot*. B) Ensayo *pull-down* usando MBP-ZDP como cebo. La proteína His-FPG (15 pmol) se incubó en columnas que contenían matriz de amilosa vacía (carril 2), o cargada con MBP (50 pmol, carril 3) o MBP-ZDP (50 pmol, carril 4). Las proteínas retenidas se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-His₆. Carril 1: 1,5 pmol de His-FPG. C) Ensayo *pull-down* usando His-FPG como cebo. La proteína MBP-ZDP o MBP (15 pmol) se incubaron en columnas que contenían matriz de Ni^{2+} -sefarosa vacía (carriles 2 y 5) o cargada con His-FPG (50 pmol, carriles 3 y 6). Las proteínas retenidas se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-MBP. Carriles 1 y 4: 0,3 y 1,5 pmoles de proteína presa (MBP-ZDP o MBP, respectivamente).

5. La inactivación de FPG en los mutantes *zdp*^{-/-} restaura la resistencia a MMS

Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que FPG actúa con anterioridad a ZDP en la ruta de reparación de ADN que contiene N7-meG, lo que sugiere que la hipersensibilidad de los mutantes *zdp*^{-/-} a MMS (Martinez-Macias *et al.*, 2012) podría deberse a la acumulación de los intermediarios de reparación con extremos 3'-P generados por FPG. Para contrastar esta hipótesis, se generó un doble mutante *fpg*^{-/-} *zdp*^{-/-} (Materiales y métodos, apartado 3.3).

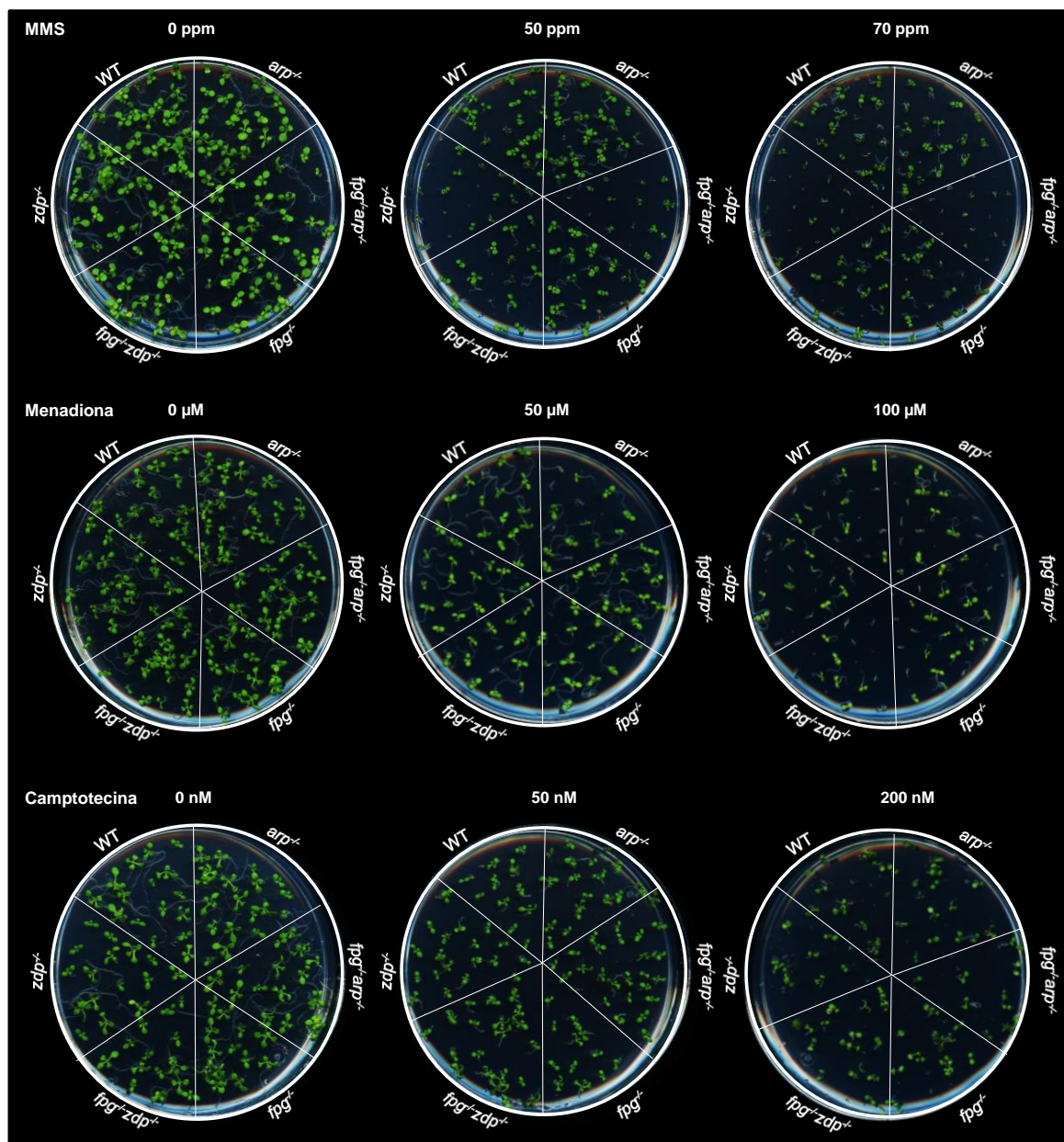


Figura 26. La inactivación del gen *FPG* en los mutantes *zdp*^{-/-} restaura la resistencia a MMS. Se crecieron durante 14 días plántulas silvestres y mutantes *fpg*^{-/-} *zdp*^{-/-}, *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-}, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} y *zdp*^{-/-} en placas con medio MS suplementado con distintas concentraciones de MMS, menadiona o camptotecina, según se indique.

Además, con el fin de evaluar el posible papel de ARP, la principal AP endonucleasa de *Arabidopsis* (Cordoba-Cañero et al., 2011), en la reparación de daños causados por agentes alquilantes, se generó un doble mutante *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-}. Posteriormente, se analizó la sensibilidad a MMS de la estirpe silvestre, de los mutante simples *zdp*^{-/-}, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} y de los mutantes dobles generados (Figura 26).

Los resultados muestran que la inactivación de *FPG* en los mutantes *zdp*^{-/-} restaura la resistencia a MMS a un nivel similar al de las plantas silvestres. Esto confirma que FPG actúa antes que ZDP durante la reparación de daños causados por agentes alquilantes, como la N7-meG. Los mutantes simples *fpg*^{-/-} o *arp*^{-/-} mostraron una sensibilidad a MMS parecida a la observada en plantas silvestres, sin embargo, la deficiencia combinada de FPG y ARP provocó un aumento de la sensibilidad, llegando a niveles similares a los observados en mutantes simples *zdp*^{-/-}. Por tanto, una deficiencia en ZDP causa una sensibilidad al MMS equivalente a la provocada por una doble deficiencia en FPG y ARP. Estos resultados sugieren que durante la reparación de los daños inducidos por MMS la vía dependiente de ARP desempeña un papel secundario, probablemente de respaldo, con respecto a la vía dependiente de FPG/ZDP.

Para investigar si FPG, ZDP y/o ARP participan en la reparación de otro tipo de lesiones se analizó en paralelo la resistencia de las distintas líneas mutantes a menadiona, un compuesto genotóxico que genera indirectamente especies reactivas de oxígeno a través de su metabolismo (Monks *et al.*, 1992) y a camptotecina, un compuesto que se une al complejo formado por el ADN y la Topoisomerasa 1, impidiendo la religación de la cadena (Liu *et al.*, 2000) y generando, por tanto, SSB. Los resultados muestran que ni deficiencias simples ni combinadas de FPG, ZDP o ARP provocan una mayor sensibilidad a menadiona o camptotecina, lo que sugiere que ninguna de estas proteínas desempeña un papel crucial en la reparación de daños causados por dichos agentes genotóxicos en las condiciones ensayadas y confirma que FPG, ZDP y ARP desempeñan funciones específicas en la reparación de daño en el ADN causado por MMS en *Arabidopsis*.

6. FPG no procesa N7-meG, sino los sitios abásicos procedentes de su depurinación espontánea

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que FPG es la principal responsable de la generación de intermediarios de reparación con extremos 3'-P durante la reparación de ADN que contiene N7-meG. Como se ha explicado anteriormente (Introducción, apartado 2.3), la N7-meG es una lesión inestable que tiende a escindirse espontáneamente del ADN generando un sitio AP, o a sufrir la apertura de su anillo de imidazol originando me-FAPy-G. Se decidió por tanto analizar la actividad de FPG sobre estos tres tipos de lesiones (Figura 27A). La presencia de N7 meG se verificó con hAAG y hAPE1 (Figura 27B, carril 5), la de me-FAPy-G con EcoFpg (Figura 27B, carril 8) y la del sitio abásico con hAPE1 (Figura 27B, carril 11). Los resultados obtenidos muestran que FPG no actúa sobre los sustratos de ADN que contienen N7 meG:C o me FAPy G:C (Figura 27B, carriles 4 y 7), pero procesa eficientemente los sitios AP generando un producto de reparación con un extremo 3'-P (Figura 27B, carril 10).

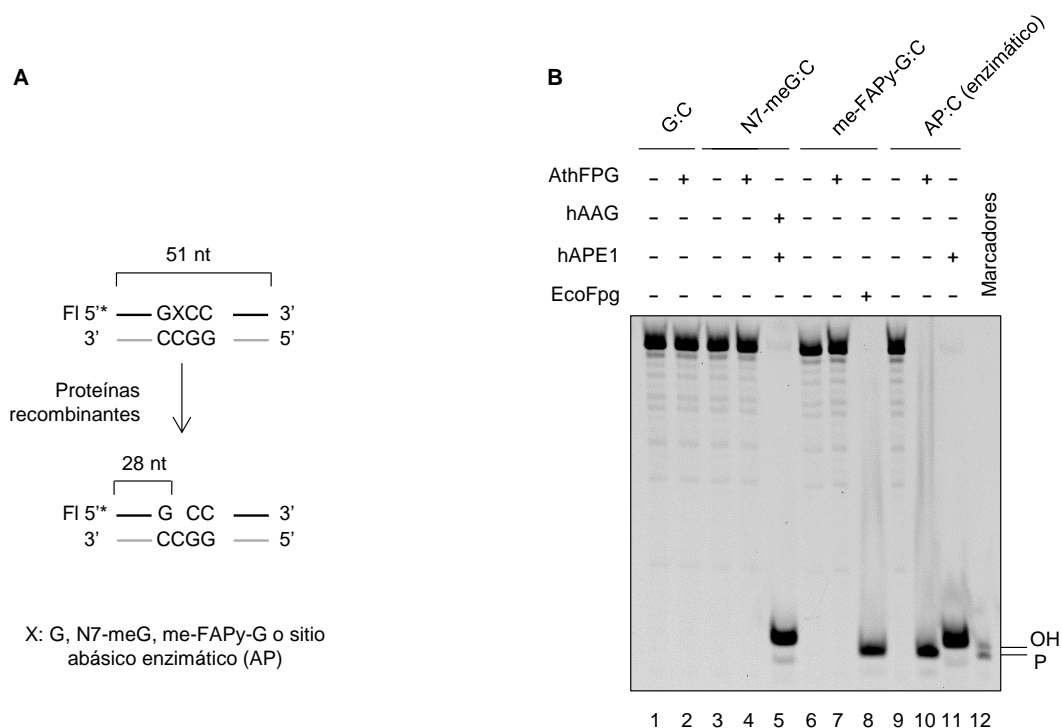


Figura 27. FPG no procesa N7-meG ni me-FAPy-G, sino sitios AP. A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión y del producto de reacción. FI, fluoresceína. B) Ensayo de incisión. Los distintos sustratos de ADN (20 nM) se incubaron durante 2 h a 37 °C en presencia de distintas combinaciones de FPG (10 nM), EcoFpg (8 U), hAAG (2 U) y/o hAPE1 (1 U). Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia.

La potente actividad AP liasa de FPG ha sido descrita con anterioridad (Kathe *et al.*, 2009), y aunque también se ha descrito que una versión truncada de FPG puede procesar me-FAPy-G con baja eficiencia (Duclos *et al.*, 2012), en las condiciones experimentales empleadas en esta Tesis no se ha detectado actividad sobre dicho sustrato, ni con extractos celulares (Figura 24) ni con la proteína recombinante (Figura 27). Los resultados descritos hasta el momento indican que la enzima FPG presente en extractos de *Arabidopsis* es necesaria para la reparación de ADN con N7-meG, aunque dicha proteína no actúa directamente sobre esta lesión ni sobre su derivado me-FAPy-G (Figura 27). Una posible explicación para esta aparente paradoja es que, durante las reacciones de reparación con extractos celulares, la N7-meG sufra una depurinación espontánea, generando sitios AP que serían procesados por la actividad AP liasa de FPG.

Para evaluar esta hipótesis se preincubó el sustrato N7-meG:C durante distintos tiempos, en ausencia de extracto celular (Figura 28). Posteriormente, el ADN se sometió a un tratamiento alcalino a 70 °C, o se incubó con hAPE1, EcoFpg o FPG (Figura 28A).

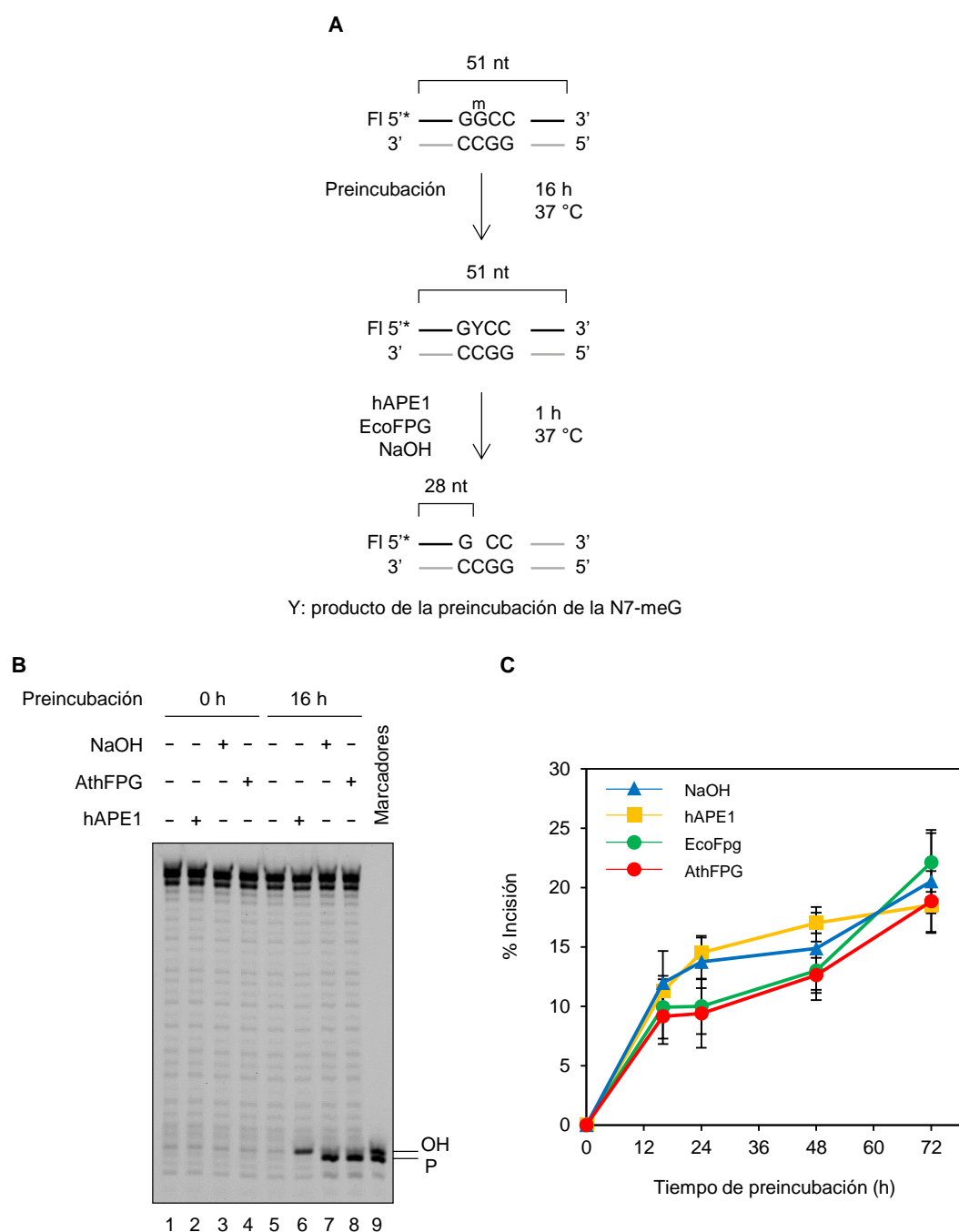


Figura 28. FPG procesa los sitios abásicos procedentes de la depuración espontánea de N7-meG. A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión y de los productos de reacción. Fl, fluoresceína; mG, N7-meG; Y, producto generado durante la preincubación de N7-meG. B) Análisis del producto de preincubación de N7-meG. El sustrato N7-meG:C (20 nM) se preincubó (0, 16, 24, 48 o 72 h) en ausencia de extractos celulares, y posteriormente se sometió a tratamiento alcalino (15 mM NaOH, 10 min a 70 °C, triángulos azules) o se trató con hAPE1 (1 U, 1 h a 37 °C, cuadros amarillos), EcoFpg (8 U, 1 h a 37 °C, círculos verdes), o FPG (10 nM, 1 h a 37 °C, círculos rojos). Tras la estabilización con NaBH₄ (230 mM), los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%, se detectaron mediante un escáner de fluorescencia y se cuantificó el nivel de incisión. El gráfico de la derecha muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que, a medida que aumenta el tiempo de preincubación del ADN en ausencia de extracto, surgen en la posición 29 sitios sensibles tanto al tratamiento alcalino a 70 °C como a las tres enzimas empleadas (Figura 28B y C). La incisión por parte de hAPE1 generó productos de 28 nt con extremos 3'-OH (Figura 28B, carril 6) mientras que la enzima FPG y el tratamiento alcalino generaron extremos 3'-P (Figura 28B, carriles 7 y 8). Además, la incisión en el sustrato de ADN con N7-meG preincubado durante distintos tiempos por parte de EcoFpg mostró un patrón de procesamiento similar al generado por FPG (Figura 28C).

Este patrón de procesamiento común para Fpg de *E. coli* y FPG de *Arabidopsis*, junto al reconocimiento de hAPE1 y la sensibilidad a NaOH sugiere que las lesiones que se acumulan tras la preincubación del sustrato son sitios abásicos. Además, la velocidad con la que surgen es compatible con la tasa de depuración de N7-meG descrita previamente para ADN bicatenario a pH neutro y 37 °C, que predice una vida media de 70-190 h (Gates *et al.*, 2004). En conjunto, estos resultados sugieren que la enzima FPG presente en los extractos celulares de *Arabidopsis* procesa eficientemente los sitios AP derivados de la depuración espontánea de N7-meG, pero no es activa frente a la propia N7-meG o su derivado me-FAPy-G.

7. FPG es la principal AP liasa detectable en extractos de *Arabidopsis*

Para evaluar la relevancia de la actividad AP liasa de FPG en *Arabidopsis*, se analizó la capacidad de los mutantes *fpg*^{-/-} para procesar sitios abásicos (Figura 29). Como sustrato se usaron sitios AP enfrentados a cada una de las cuatro bases, generados por la escisión de uracilo mediante incubación previa con la ADN glicosilasa monofuncional UDG (Figura 29A). La escisión completa del uracilo se confirmó mediante tratamiento alcalino (Figura 29B, carriles 15-18).

A continuación, los sustratos de ADN se incubaron con extractos de plantas silvestres o mutantes *fpg*^{-/-} en ausencia de magnesio (Figura 29B, carriles 1-12). Puesto que este catión es esencial para la actividad de AP endonucleasas, en estas condiciones sólo es detectable la actividad AP liasa. Los resultados muestran que los extractos celulares de plantas silvestres procesaron los sitios abásicos, independientemente del tipo de base opuesta, generando intermediarios de reparación con extremos 3'-P (Figura 29B, carriles 9-12). Por el contrario, los extractos celulares de plantas *fpg*^{-/-} no generaron ningún intermediario de reparación (Figura 29B, carriles 5-8). Reacciones control en presencia de magnesio (Figura 29C, carriles 9-12), verificaron que los mutantes *fpg*^{-/-} retienen actividad AP endonucleasa, confirmando así que son deficientes específicamente en actividad AP liasa. Estos resultados indican que FPG es la única AP liasa detectable en extractos celulares de *Arabidopsis*, al menos en las condiciones ensayadas.

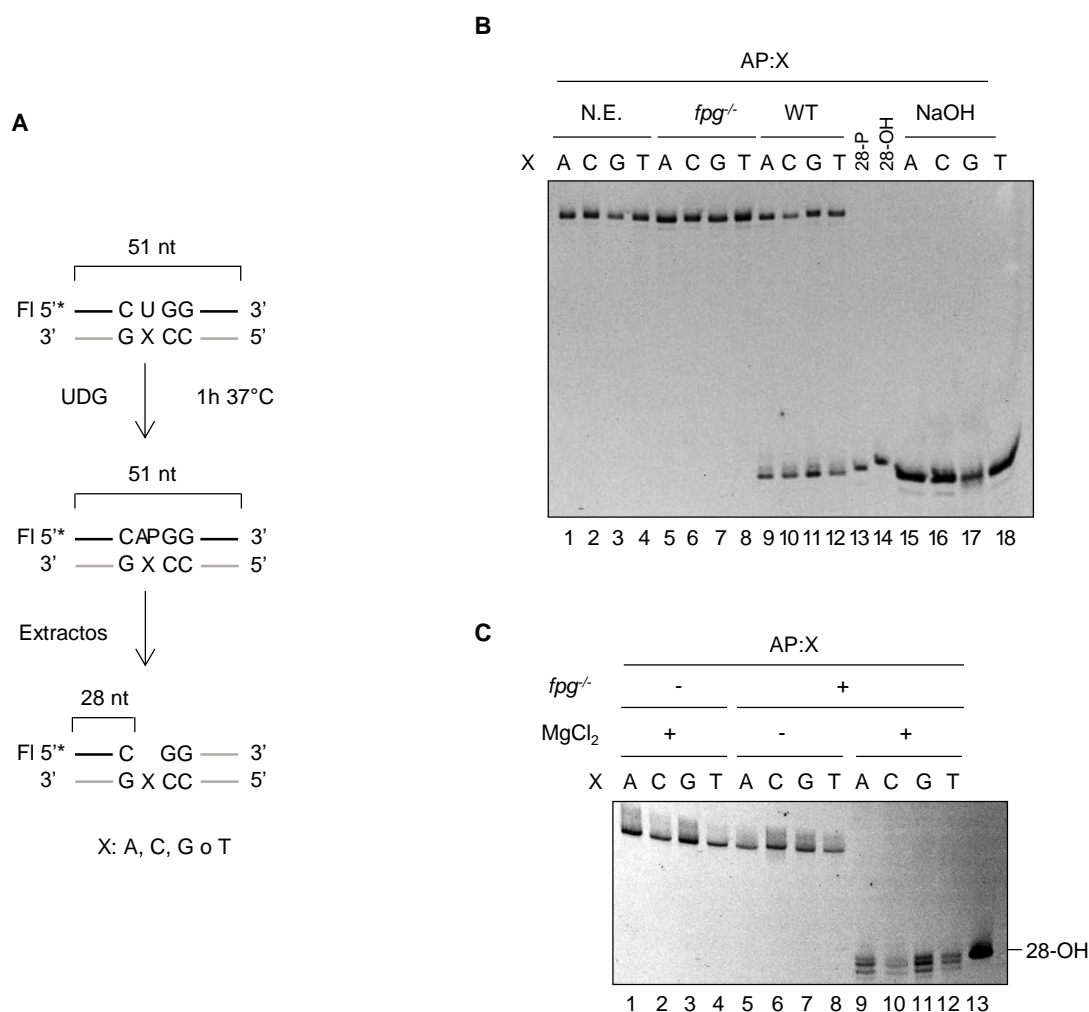


Figura 29. FPG es la única AP liasa detectable en extractos celulares de *Arabidopsis*. A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión y del producto de reacción esperado. El dúplex U:X (20 nM) se incubó con UDG (1,5 U) a 37 °C durante 1 h para obtener sitios AP. B) Análisis de la actividad AP liasa de extractos *fpg*^{-/-}. Los sitios AP (20 nM) se incubaron con extractos celulares silvestres o *fpg*^{-/-} (15 µg) durante 4 h a 37 °C en ausencia de MgCl₂. Los sustratos también se sometieron a tratamiento alcalino para verificar la presencia de los sitios AP. C) Análisis de la actividad AP endonucleasa de extractos *fpg*^{-/-}. Los sitios AP (20 nM) se incubaron con extractos celulares silvestres o *fpg*^{-/-} (15 µg), en presencia o ausencia de MgCl₂, durante 2 h a 37 °C. En todos los casos los productos de reacción se estabilizaron con NaBH₄ (230 mM), se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia.

8. El magnesio estimula la actividad AP liasa de FPG

Se ha descrito que proteínas que participan en la ruta BER estimulan a proteínas que actúan en el paso precedente. Así, en *Arabidopsis*, ZDP estimula la actividad de la ADN glicosilasa ROS1 (Martinez-Macias *et al.*, 2012), y en células humanas hAPE1 estimula a las ADN glicosilasas Ogg1 (Vidal *et al.*, 2001) y hAAG (Baldwin and O'Brien, 2009).

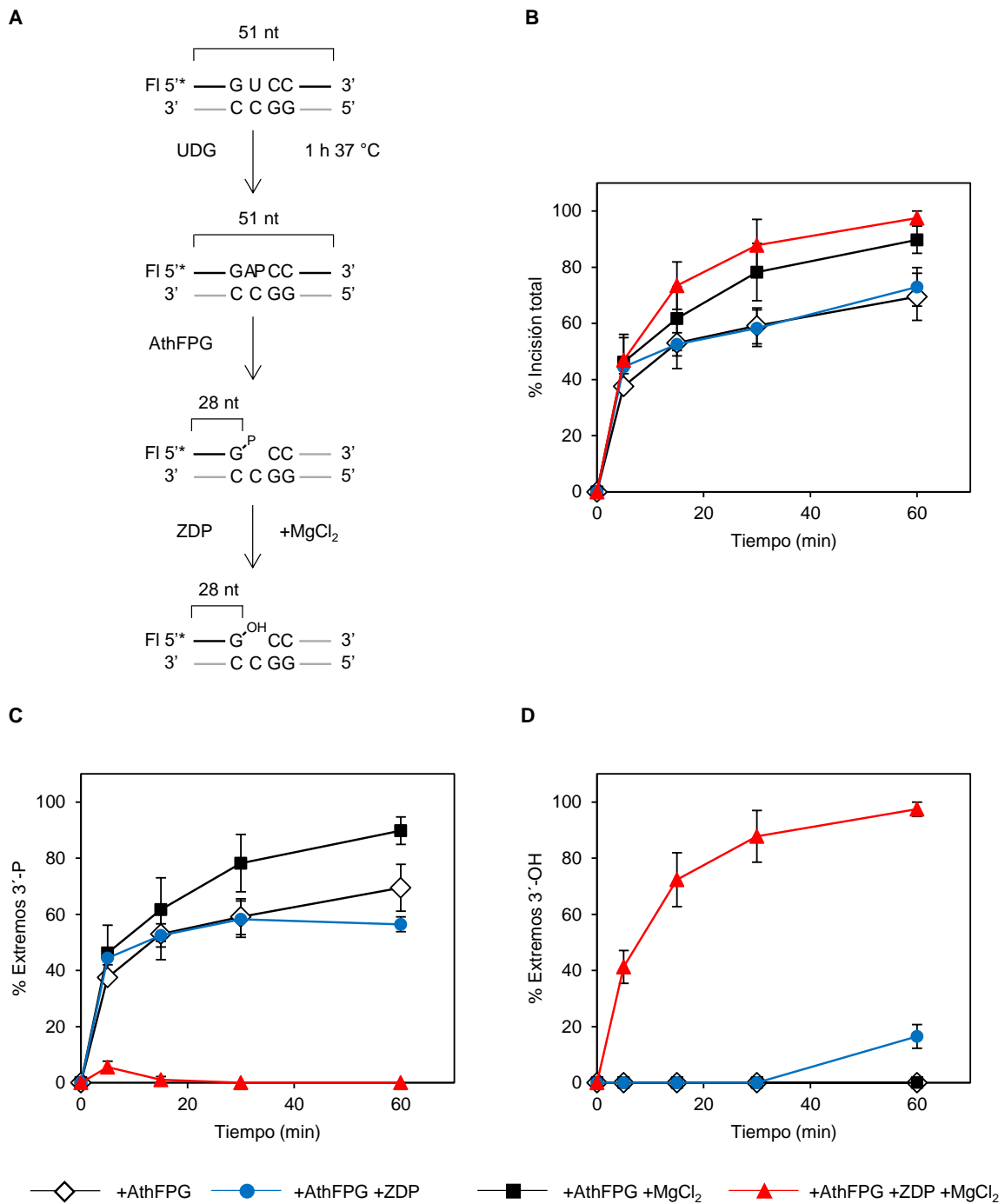


Figura 30. Los iones Mg^{2+} estimulan la actividad AP liasa de FPG. A) Diagrama esquemático del sustrato empleado en el ensayo de incisión y de los productos de reacción esperados. El dúplex U:C (20 nM) se incubó con UDG (1,5 U) a 37 °C durante 1 h para obtener el sustrato AP:C, que, posteriormente, se incubó a 37 °C en presencia de distintas combinaciones de FPG (4 nM), ZDP (4 nM) y/o $MgCl_2$ (2 mM). Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (5, 15, 30 y 60 min) y tras la estabilización con $NaBH_4$ (230 mM), los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliácridamida al 12%, se detectaron mediante un escáner de fluorescencia y se cuantificó el nivel de incisión. Se representa la media y el error estándar de dos experimentos independientes, en los que se cuantificó la incisión total (B), los intermediarios de reparación con extremos 3'-P (C) y los intermediarios de reparación con extremos 3'-OH (D).

Puesto que FPG y ZDP intervienen en pasos consecutivos de la ruta de reparación de sitios abásicos procedentes de la depurinación espontánea de N7-meG (Figura 24) se examinó la posibilidad de que ZDP estimule la actividad AP liasa de FPG (Figura 30).

Para ello se realizó un ensayo de incisión con ambas proteínas recombinantes, empleando un sustrato de ADN que contiene un sitio AP enfrentado a citosina (AP:C) en presencia o ausencia de magnesio (Figura 30A), ya que la presencia de este catión es necesaria para la actividad de ZDP (Petrucchio *et al.*, 2002). Los resultados muestran que ZDP no estimula la actividad AP liasa de FPG (Figura 30B). Sin embargo, dicha actividad aumenta significativamente en presencia de magnesio, independientemente de la presencia de ZDP (Figura 30B). El examen de los niveles relativos de intermediarios con extremos 3'-P y 3'-OH confirmó que los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad fosfatasa de ZDP, pero no para la actividad AP liasa de FPG. Sin embargo, incrementan notablemente esta última (Figura 30C-D).

En conjunto, estos resultados sugieren que la reparación de sitios AP mediante la vía FPG-ZDP se ve modulada por los niveles de magnesio.

9. ARP, la principal AP endonucleasa de *Arabidopsis*, no participa en la reparación de sitios AP procedentes de la depurinación espontánea de N7-meG

Los resultados descritos hasta el momento sugieren que la reparación de los sitios abásicos procedentes de la depurinación espontánea de N7-meG tiene lugar a través de una vía dependiente de la actividad AP liasa de FPG, en la que la AP endonucleasa ARP parece desempeñar un papel secundario. Sin embargo, y en aparente contradicción con esta conclusión, se ha observado previamente que ARP desempeña un papel importante en la reparación de sitios abásicos procedentes de la escisión de uracilo (Córdoba-Cañero *et al.*, 2010).

Por tanto, se decidió examinar en detalle la importancia relativa de FPG y ARP en la reparación de sitios AP de origen no enzimático (como los surgidos por depurinación espontánea de N7-meG) o enzimático (como los surgidos por escisión de uracilo) (Figura 32A). Se prepararon extractos celulares de plantas silvestres, mutantes simples *fpg*^{-/-} y *arp*^{-/-}, y mutantes dobles *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} y se verificó previamente que todos presentaban una eficacia reparadora similar comparando su actividad uracil ADN glicosilasa (Figura 31). A continuación, se analizó el nivel de actividad AP liasa y AP endonucleasa de los distintos extractos empleando como sustrato ADN con un sitio abásico de origen enzimático, obtenido por la escisión de uracilo por UDG, enfrentado a citosina (Figura 32B, panel izquierdo). Con el fin de mimetizar la depurinación parcial de ADN que contiene N7-meG, el sustrato de ADN que contiene el sitio AP se mezcló con un homodúplex G:C en una proporción 1:9.

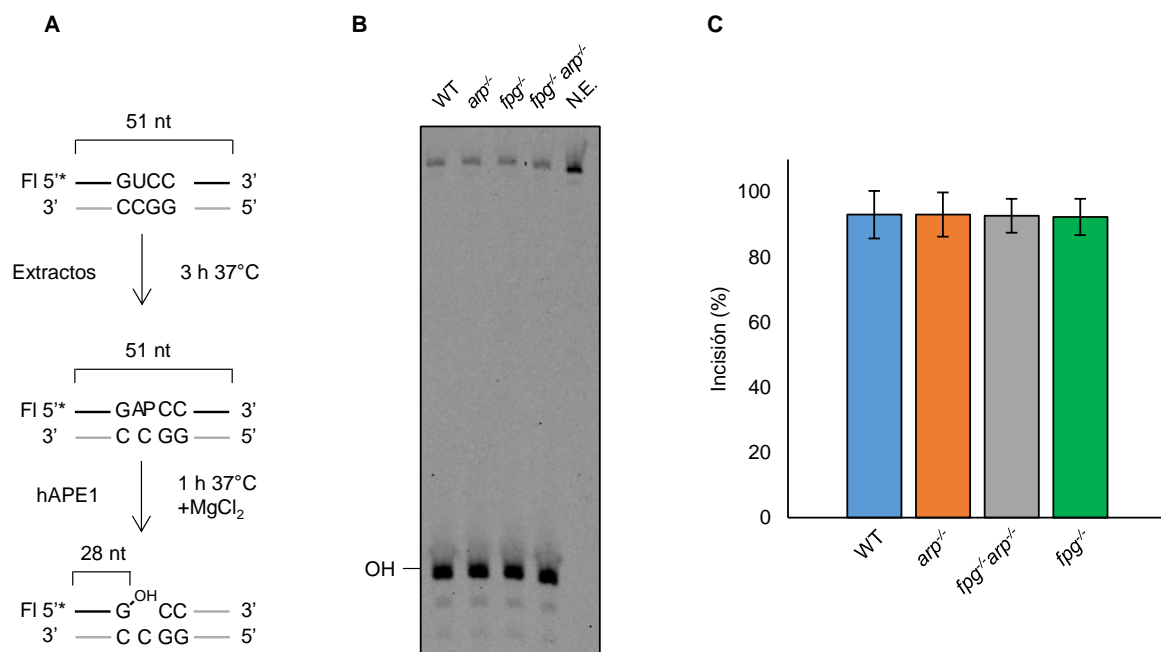


Figura 31. Los extractos deficientes en FPG y ARP escinden uracilo con la misma eficiencia que los extractos silvestres. A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión y del producto de reacción esperado. B) Análisis de la actividad uracil ADN glicosilasa en extractos silvestres y mutantes *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} o *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-}. El ADN U:C (20 nM) se incubó durante 3 h a 37 °C con extractos silvestres, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} o *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} (8 µg), y posteriormente con hAPE1 (10 U) y MgCl₂ (2 mM) durante 1 h a 37 °C. Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron por fluorescencia. Se muestra un gel representativo. C) Cuantificación de la actividad uracil ADN glicosilasa en extractos celulares de *A. thaliana*. Los valores son la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que los extractos *arp*^{-/-} catalizaron la incisión del sitio abásico generado de forma enzimática con una eficiencia similar a los extractos silvestres, tanto en ausencia como en presencia de Mg²⁺ (Figura 32B, carriles 2-3 y 7-8), lo que indica que los extractos *arp*^{-/-} solo poseen actividad AP liasa, que es independiente de dicho ión. Por otra parte, los extractos *fpg*^{-/-} catalizaron la incisión del sitio AP sólo en presencia de Mg²⁺ (Figura 32B, carriles 4 y 9), lo que refuerza los resultados previos obtenidos en esta Tesis (Figura 29), demostrando que estos extractos solo poseen actividad AP endonucleasa, dependiente de magnesio. Por su parte, los extractos *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} no procesaron los sitios AP, ni en presencia ni en ausencia de magnesio, aunque se detectó una pequeña proporción de productos en forma de β-eliminación procedentes presumiblemente de la hidrólisis espontánea de los sitios AP (Figura 32B, carriles 5 y 10).

Todos estos resultados indican que las únicas actividades AP liasa y AP endonucleasa detectables en extractos de *Arabidopsis* proceden de FPG y ARP, respectivamente.

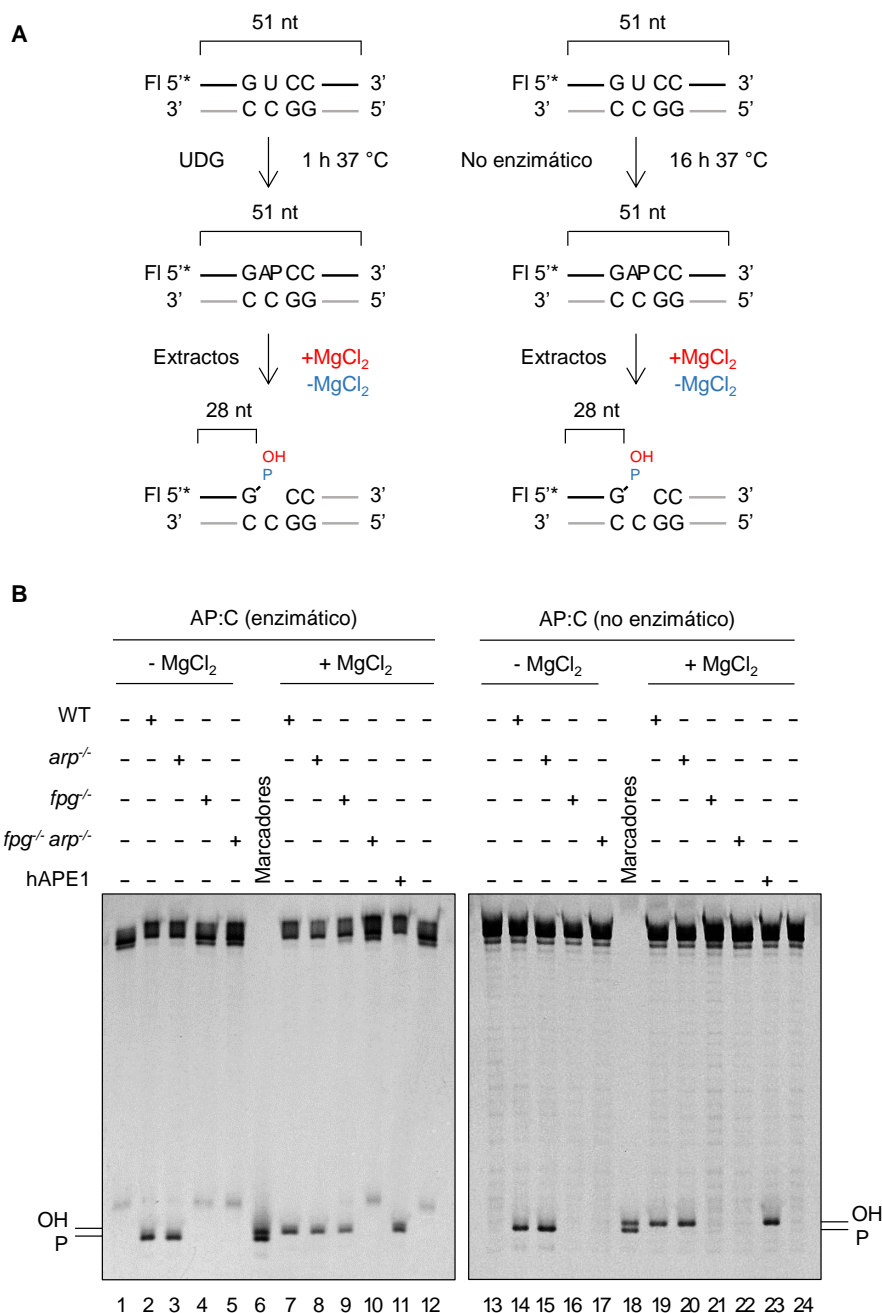


Figura 32. ARP no participa en la reparación de sitios AP generados por depuración espontánea de N7-meG. Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión y de los productos de reacción esperados. La adición de magnesio y el extremo del producto de reacción esperado se señalan en rojo, en azul se señala el producto esperado de la reacción sin magnesio. El sustrato de ADN con un sitio AP:C se generó enzimáticamente, mediante la escisión de uracilo por UDG (1 h 37 °C) (izquierda), o por depuración espontánea de N7-meG (16 h, 37 °C) (derecha). B) Análisis de la incisión de sitios AP con distinto origen por parte de extractos silvestres, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} o *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-}. El sustrato AP:C generado con UDG (1 h 37 °C) (2 nM), se compensó con un dúplex G:C (18 nM), mientras que el sustrato AP:C se obtuvo mediante incubación de ADN que contiene N7-meG (20 nM) durante 16 h a 37 °C. Ambos sustratos se incubaron durante 1 h a 37 °C con extractos silvestres, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} o *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} (8 µg), hAPE1 (10 U) y MgCl₂ (2 mM), según se indique. Tras la estabilización con NaBH₄ (230 mM), los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliácridamida al 12% y se detectaron por fluorescencia. Se muestra un gel representativo.

Paralelamente, se realizaron reacciones de incisión análogas usando como sustrato ADN con un sitio abásico procedente de la depurinación espontánea de N7-meG (Figura 32B, panel derecho). Como ya se ha demostrado previamente (Figura 24B, carril 2), en ausencia de magnesio los extractos silvestres generaron un intermediario de reparación con extremo 3'-P que es procesado a 3'-OH en presencia de magnesio (Figura 32B, carriles 14 y 19). Los extractos *arp*^{-/-} mostraron un patrón de incisión muy similar al de los extractos silvestres (Figura 32B, carriles 15 y 20). Sin embargo, los extractos procedentes de plantas *fpg*^{-/-} no catalizaron ningún tipo de incisión, ni en ausencia ni en presencia de magnesio (Figura 32B, carriles 16 y 21), tal y como se ha demostrado previamente (Figura 24B, carriles 4 y 8). Del mismo modo, las reacciones catalizadas por extractos del doble mutante *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} no mostraron ningún intermediario de reparación (Figura 32B, carriles 17 y 22).

En conjunto, estos resultados indican que la incisión del sitio abásico procedente de la depurinación espontánea de N7-meG es dependiente de FPG e independiente de ARP.

10. El sitio abásico procedente de la depurinación espontánea de N7-meG es reparado a través de una ruta SP-BER dependiente de FPG

Previamente se ha sugerido que cuando la ruta BER es iniciada por ADN glicosilasas monofuncionales puede continuar tanto vía SP como LP, mientras que cuando es iniciada por ADN glicosilasas bifuncionales, continua fundamentalmente vía SP (Fortini *et al.*, 1999). Dado que la reparación de los sitios AP procedentes de la depurinación espontánea de N7-meG es dependiente de la actividad AP liasa de la ADN glicosilasa bifuncional FPG, se esperaba que la reparación transcurriese principalmente vía SP.

Para examinar esta cuestión, se realizaron ensayos de inserción de desoxinucleótidos con extractos silvestres y mutantes *arp*^{-/-}, *fpg*^{-/-} y *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-}, en presencia de dGTP o de los cuatro dNTPs, con sustratos de ADN que contienen sitios AP de origen enzimático o no enzimático (Figura 33A). La concentración de los distintos sitios AP se verificó mediante tratamiento con hAPE1 (Figura 33B, carriles 2 y 17). Cuando las reacciones se llevaron a cabo con sitios AP de origen enzimático, tanto los extractos silvestres como los de los mutantes simples *arp*^{-/-} y *fpg*^{-/-} catalizaron la inserción de un solo desoxinucleótido, en presencia de dGTP (Figura 33B, carriles 5, 8 y 11), mientras que insertaron hasta tres desoxinucleótidos, en presencia de los cuatro dNTPs (Figura 33B, carriles 6, 9 y 12), lo que sugiere que la reparación puede ocurrir tanto a través de SP como de LP-BER. Como se esperaba, en las reacciones catalizadas por extractos celulares del doble mutante *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-}, no se observó ningún intermediario de reparación (Figura 33B, carriles 13-15).

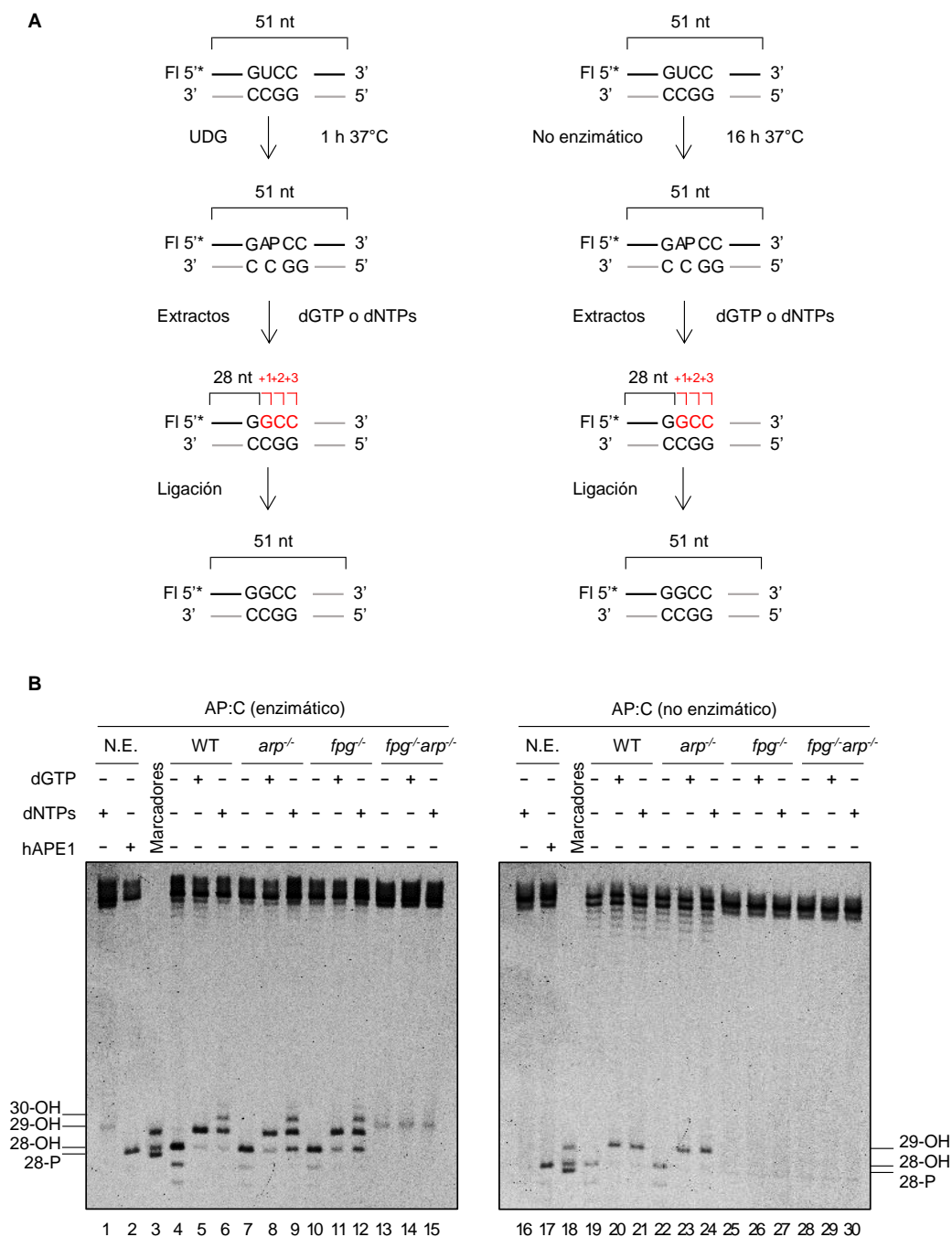


Figura 33. Los sitios AP procentes de la depurinación espontánea de N7-meG se reparan a través de una vía SP-BER dependiente de FPG. A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión y de los productos de reacción. El sustrato de ADN con un sitio AP:C se generó enzimáticamente, mediante la escisión de uracilo por UDG (1 h 37 °C) (izquierda), o por depurinación espontánea de N7-meG (16 h, 37 °C) (derecha). En rojo se señalan los intermediarios de reparación con inserción de desoxinucleótido(s). B) Análisis de la reparación de sitios AP con distinto origen por parte de extractos silvestres, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} o *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-}. Los sustratos de ADN se incubaron en una reacción de reparación con dGTP (20 μM) o dNTPs (20 μM de cada uno) en presencia de los distintos extractos (8 μg) o de hAPE1 (10 U) durante 3 h a 37 °C. Tras la estabilización con NaBH₄ (230 mM), los productos de reacción se separaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia. Se muestra un gel representativo.

Dado que las actividades de FPG y ARP son las únicas detectables en los extractos celulares *arp*^{-/-} y *fpg*^{-/-} (Figura 32B), respectivamente, y puesto que en ambos mutantes se observa tanto SP- como LP-BER, estos resultados sugieren que la naturaleza de la enzima que realiza la incisión del sitio AP no es el único factor que determina la elección entre SP o LP-BER.

Cuando se empleó como sustrato un sitio abásico procedente de la depurinación espontánea de N7-meG, los extractos silvestres insertaron un único desoxinucleótido, incluso cuando se incubaron en presencia de los cuatro dNTPs (Figura 33B, carriles 20 y 21). El mismo patrón de inserción se observó en las reacciones catalizadas por extractos celulares *arp*^{-/-}, que solo exhiben la actividad AP liasa de FPG (Figura 33B, carriles 23 y 24). Como se esperaba, no se observaron intermediarios de reparación en las reacciones catalizadas por extractos de los mutantes *fpg*^{-/-} o *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} (Figura 33B, carriles 25-30).

Estos resultados sugieren que los sitios AP procedentes de la escisión no enzimática de la N7-meG son reparados a través de una vía SP-BER dependiente de FPG.

11. La escisión no enzimática de N7-meG canaliza la reparación hacia una vía independiente de AP endonucleasas

Los resultados mostrados hasta ahora apoyan la hipótesis de que la escisión no enzimática de N7-meG canaliza la reparación hacia una vía dependiente de la actividad AP liasa de FPG e independiente de la actividad AP endonucleasa de ARP. Para poner a prueba esta hipótesis se comparó la actividad de ambas proteínas, tanto en su forma nativa en extractos como en su forma recombinante, sobre sitios abásicos generados mediante liberación enzimática o no enzimática de N7-meG (Figura 34).

La proteína recombinante FPG procesó con la misma eficiencia los sitios AP independientemente de su origen (Figura 34A). Del mismo modo, la actividad de la enzima FPG nativa, presente en los extractos de las plantas mutantes *arp*^{-/-}, no mostró diferencias en el procesamiento de ambos tipos de sitios AP (Figura 34B). Por el contrario, la proteína recombinante ARP procesó los sitios AP generados enzimáticamente pero no los procedentes de la depurinación espontánea de N7-meG (Figura 34C). Los extractos procedentes de los mutantes *fpg*^{-/-}, que sólo poseen la actividad de ARP para procesar los sitios AP (Figura 29), también procesaron los sitios AP de origen enzimático pero no los sitios AP de origen no enzimático (Figura 34D). En comparación, la proteína recombinante hAPE1 procesó con la misma eficiencia ambos tipos de sitios abásicos (Figura 35).

En conjunto, estos resultados indican que ARP es capaz de discriminar entre los sitios AP generados por liberación enzimática de la N7-meG y aquellos producidos por su depurinación espontánea.

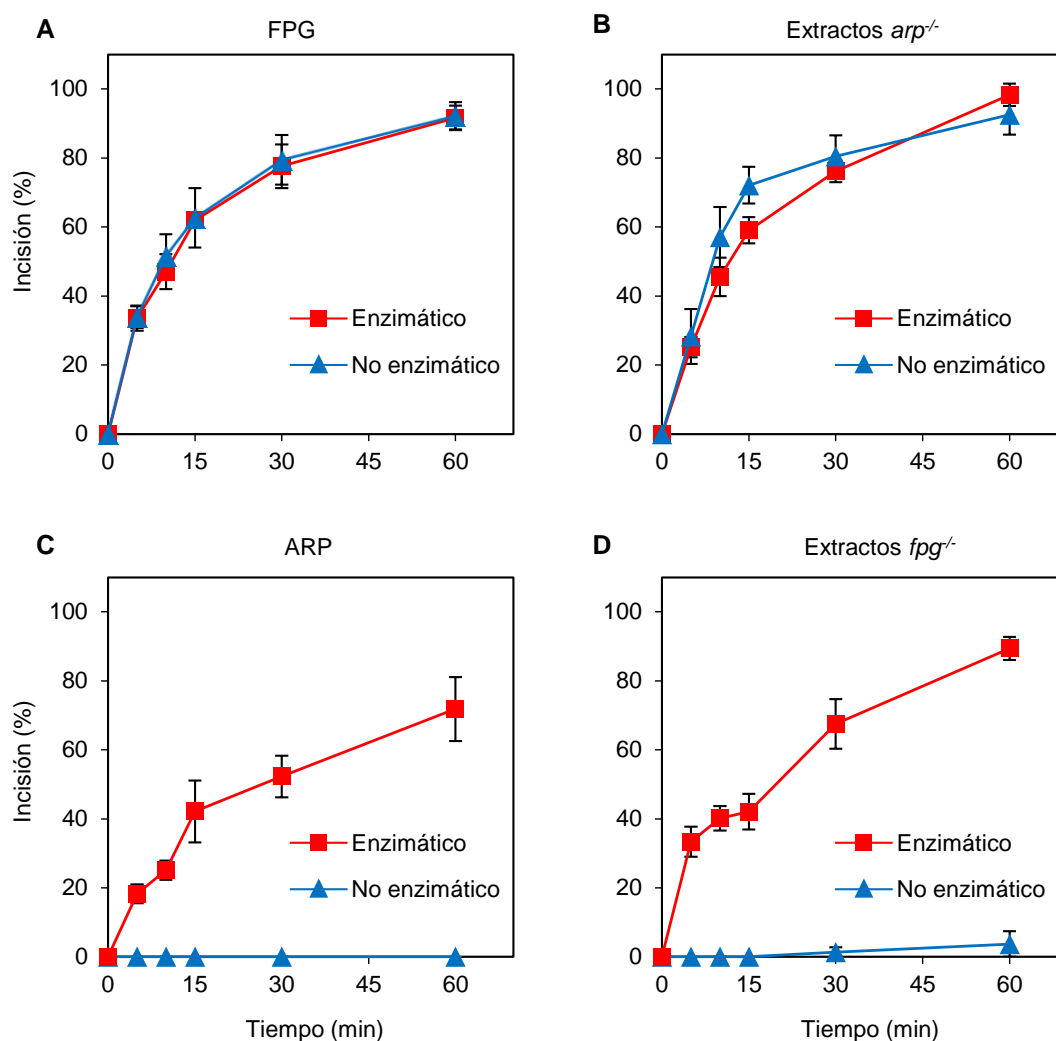


Figura 34. ARP discrimina entre los sitios AP generados por escisión enzimática de la N7-meG y los producidos por su depurinación espontánea. Los sustratos de ADN (20 nM) son una mezcla 9:1 de homodúplex G:C y de heterodúplex AP:C con un sitio AP generado por escisión enzimática de N7-meG con hAAG (enzimático, cuadrados rojos) o por depurinación espontánea de N7-meG (triángulos azules). Ambos sustratos se incubaron con las proteínas recombinantes [(A) FPG: 0,5 nM; (C) ARP 10 nM] o extractos de *Arabidopsis* [(B) *arp*^{-/-}: 8 µg; (D) *fpg*^{-/-}: 8 µg]. Las reacciones para la detección de actividad AP endonucleasa (C y D) se suplementaron con MgCl₂ (2 mM). Tras la estabilización con NaBH₄, los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia. Los valores son la media con error estándar de tres experimentos independientes.

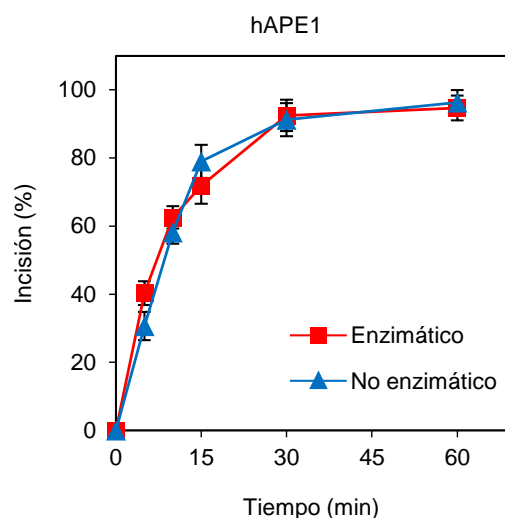


Figura 35. La AP endonucleasa humana 1 no discrimina entre sitios AP generados por liberación enzimática o no enzimática de N7-meG. Los sustratos de ADN (20 nM) son una mezcla 9:1 de homodúplex G:C y de heterodúplex AP:C con un sitio AP generado por escisión enzimática de N7-meG con hAAG (enzimático, cuadrados rojos) o por depurinación espontánea de N7-meG (triángulos azules). Ambos sustratos se incubaron con hAPE1 (0,01 U) en presencia $MgCl_2$ (2 mM). Tras la estabilización con $NaBH_4$, los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia. Los valores son la media con error estándar de tres experimentos independientes.

12. La identidad de la base enfrentada a un sitio AP generado enzimáticamente influye en la eficiencia relativa de AP endonucleasas y AP liasas

Los resultados descritos anteriormente indican que tanto ARP como FPG son activas frente a sitios AP generados enzimáticamente. Es importante resaltar que en todos los experimentos descritos hasta el momento el sustrato empleado tenía una C como base enfrentada al sitio AP. Sin embargo, los sitios AP generados *in vivo* procedentes de la escisión enzimática de N7-meG y uracilo (citocina desaminada) se encuentran enfrentados a C y G, respectivamente.

Para analizar con más detalle la preferencia de sustrato de las principales AP liasa y AP endonucleasa en *Arabidopsis*, FPG y ARP, se generaron sitios AP de origen enzimático enfrentados a C o G (Figura 36). Mientras que FPG mostró niveles de incisión similares sobre los dos sustratos (Figura 36A), la proteína recombinante ARP presentó una clara preferencia por los sitios AP enfrentados a G (Figura 36C). La misma preferencia mostraron tanto la proteína ARP nativa, presente en los extractos *fpg*^{-/-} (Figura 36D), como la proteína hAPE1 (Figura 37).

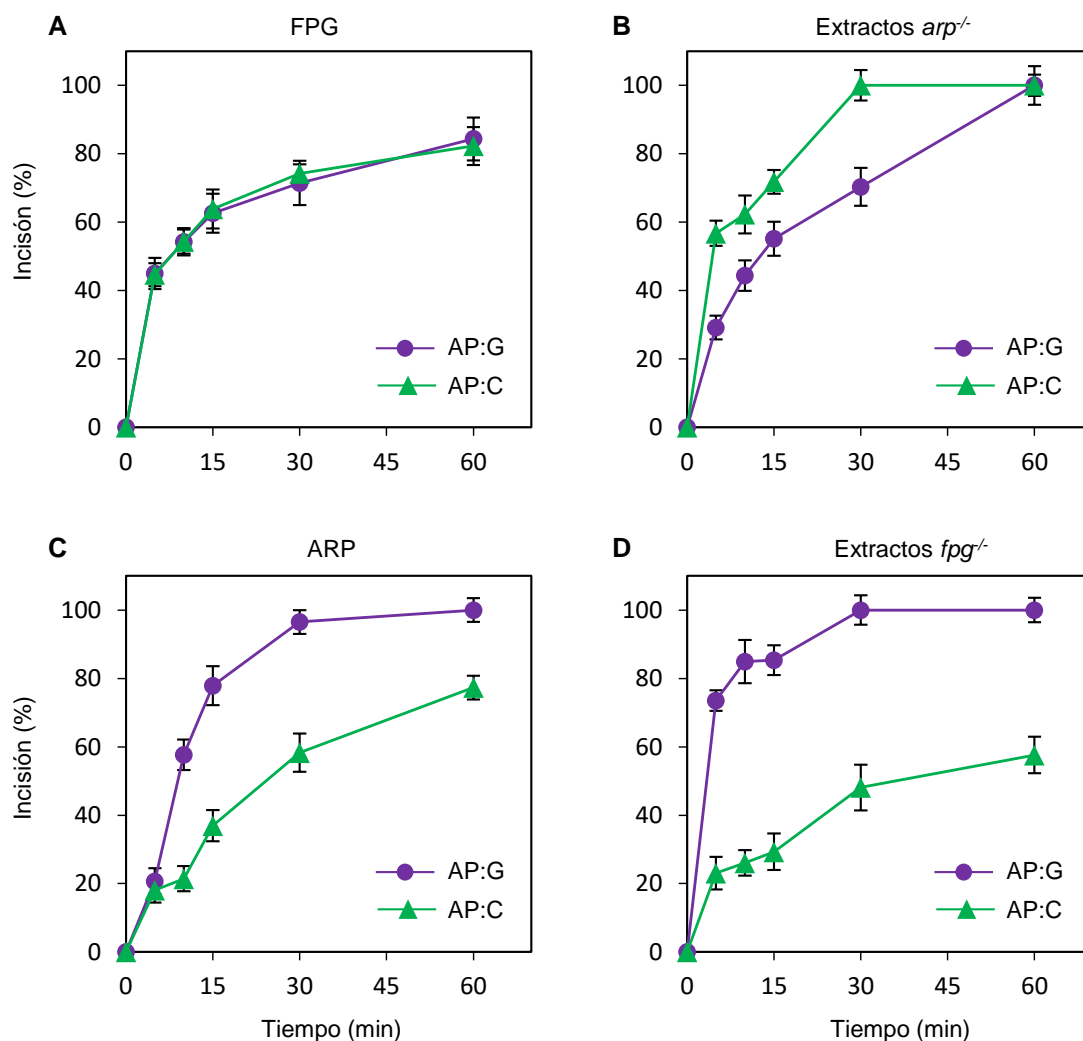


Figura 36. La identidad de la base opuesta al sitio abásico influye en la actividad AP endonucleasa y AP liasa. Los sustratos de ADN (2 nM) contienen un único sitio AP:G (círculos morados) o AP:C (círculos verdes), ambos generados por la escisión enzimática de uracilo. Ambos sustratos se incubaron con las proteínas recombinantes [(A) FPG: 0,5 nM; (C) ARP 10 nM] o extractos de *Arabidopsis* [(B) *arp*^{-/-}: 8 µg; (D) *fpg*^{-/-}: 8 µg]. Las reacciones para la detección de actividad AP endonucleasa (C y D) se suplementaron con MgCl₂ (2 mM). Tras la estabilización con NaBH₄, los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia. Los valores son la media con error estándar de dos experimentos independientes.

Sin embargo, y a diferencia de la proteína recombinante FPG, la proteína nativa FPG, que constituye la única actividad detectable en los extractos *arp*^{-/-}, mostró una mayor actividad sobre sitios AP enfrentados a C (Figura 36B). Todos estos resultados sugieren que, en el caso de sitios AP de origen enzimático, la identidad de la base opuesta influye en la elección de una vía de reparación dependiente de AP liasas o de AP endonucleasas.

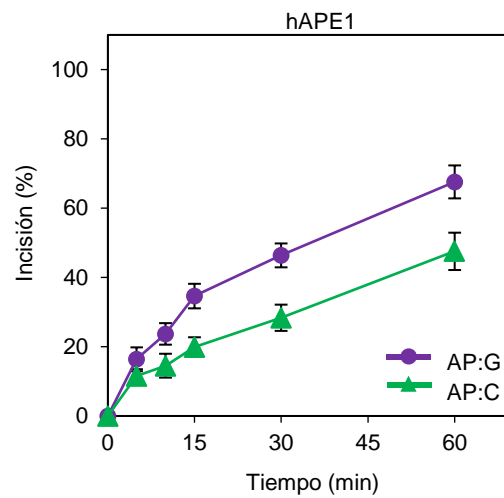


Figura 37. La identidad de la base opuesta al sitio abásico influye en procesamiento de hAPE1. Los sustratos de ADN (2 nM) contienen un único sitio AP:G (círculos morados) o AP:C (círculos verdes), ambos generados por la escisión enzimática de uracilo. Ambos sustratos se incubaron con hAPE1 (0,01 U) en presencia de $MgCl_2$ (2 mM). Tras la estabilización con $NaBH_4$, los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron mediante un escáner de fluorescencia. Los valores son la media con error estándar de tres experimentos independientes.

Discusión

1. El papel de FPG y ZDP en la reparación del daño causado por agentes alquilantes en *Arabidopsis*

La motivación inicial de esta Tesis Doctoral ha sido entender por qué los mutantes *zdp*^{-/-} son hipersensibles a MMS. El estudio genético y bioquímico realizado sugiere que la liberación no enzimática de N7-meG, la lesión más abundante generada por MMS, canaliza la reparación hacia una ruta independiente de AP endonucleasas, en la que la AP liasa FPG y la ADN 3'-fosfatasa ZDP llevan a cabo pasos consecutivos durante su reparación (Figura 38). En dicha ruta, el sitio abásico procedente de la depurinación espontánea de N7-meG es procesado por FPG a través de una reacción de β , δ -eliminación, generando intermediarios de reparación con un hueco mononucleotídico precedido por un extremo 3'-P que es hidrolizado a 3'-OH por ZDP.

El hecho de que la inactivación de *FPG* en plantas mutantes *zdp*^{-/-} restaure parcialmente la resistencia a MMS (Figura 26) sugiere que los intermediarios de reparación con extremos 3'-P generados por FPG son más citotóxicos que los sitios abásicos. Un hecho similar ha sido descrito previamente en *S. cerevisiae*, donde las lesiones generadas por alquilación son escindidas por la ADN glicosilasa MAG1 (Bjoras *et al.*, 1995) y los sitios abásicos generados procesados por la actividad AP liasa de NTG1 y NTG2 (Eide *et al.*, 1996; You *et al.*, 1998). Estas enzimas, homólogas de la ADN glicosilasa Nth de *E. coli*, generan intermediarios de reparación con extremos 3'-PUA que son procesados por la AP endonucleasa Apn2. La delección de *NTG1* y *NTG2* contrarresta parcialmente la sensibilidad a MMS del doble mutante *apn1 apn2*, probablemente debido a que no se produce la acumulación de intermediarios de reparación con extremos 3'-PUA (Hanna *et al.*, 2004). En *S. pombe*, Nth1 es la principal enzima encargada de procesar los sitios AP, mientras que Apn2 se encarga de procesar los intermediarios de reparación con extremos 3'-PUA. La delección de *nth1* también revierte parcialmente la sensibilidad a MMS del mutante *apn2* (Alseth *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren el interés de examinar con detalle las actividades relativas de AP liasas y AP endonucleasas de levaduras durante la reparación de sitios AP con origen enzimático y no enzimático.

A diferencia de la ruta de reparación descrita en levaduras, donde las AP endonucleasas procesan el extremo 3'-PUA generado por los homólogos de Nth, la ruta de reparación en *Arabidopsis* es independiente de AP endonucleasas, ya que los intermediarios con extremos 3'-P generados por FPG son procesados por ZDP. Algo similar sucede durante la reparación de bases oxidadas en células de mamífero, donde las ADN glicosilasas NEIL1 y NEIL2 generan intermediarios de reparación con extremos 3'-P que son procesados por PNKP, homólogo de ZDP (Wiederhold *et al.*, 2004). De hecho, las células deficientes en PNKP, al igual que las plantas deficientes en ZDP, son sensibles a MMS (Rasouli-Nia *et al.*, 2004).

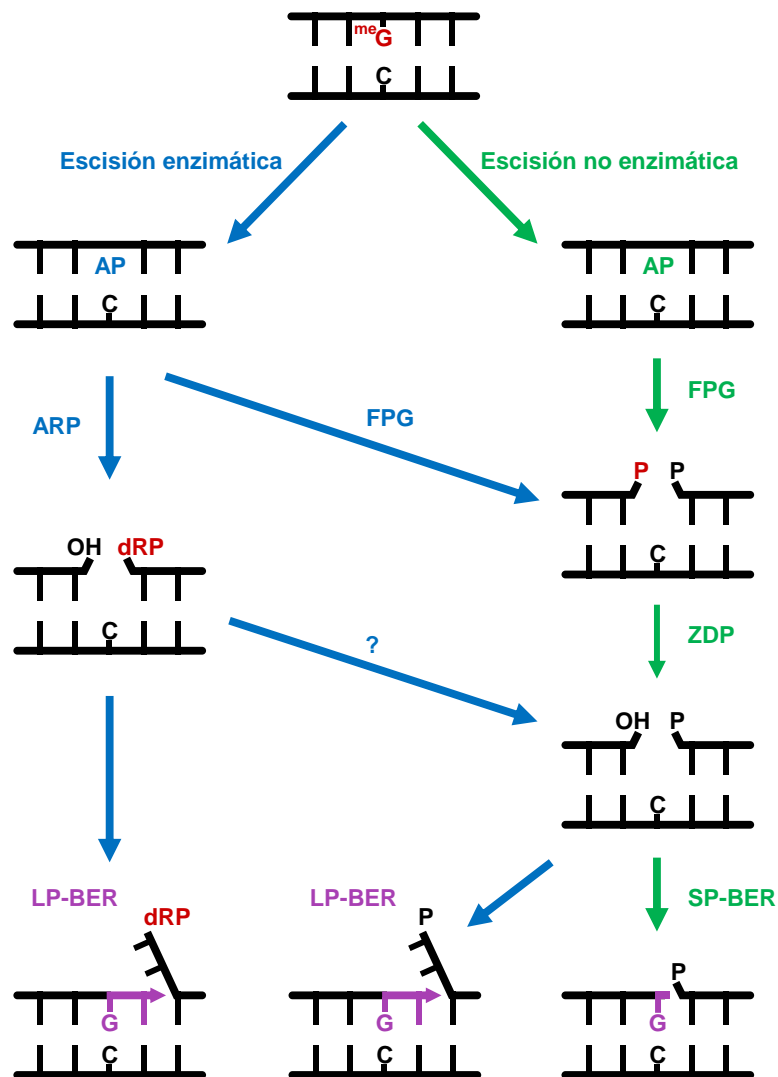


Figura 38. Modelo de la ruta de reparación de sitios AP en *Arabidopsis*. FPG procesa los sitios AP procedentes de la depurinación espontánea de N7-meG en una vía independiente de AP endonucleasas. Los intermediarios de reparación generados, que presentan un hueco mononucleotídico con un extremo 3'-P, son procesados por la ADN 3'-fosfatasa ZDP y la reparación continúa con la inserción de un único desoxinucleótido (SP-BER). Por el contrario, los sitios AP generados por escisión enzimática de N7-meG pueden ser procesados tanto por ARP como por FPG, y su reparación puede continuar por SP o por LP-BER.

Esto sugiere que el sistema NEIL/PNKP podría participar también en la reparación de los sitios AP generados por depurinación espontánea de N7-meG o por ADN glicosilasas monofuncionales que escinden lesiones inducidas por MMS, como la alquilpurina ADN glicosilasa hAAG (Wiederhold *et al.*, 2004). También se ha sugerido que la ruta dependiente de PNKP actúa como ruta auxiliar en la reparación de sitios AP en *S. pombe* (Kashkina *et al.*, 2012; Nilsen *et al.*, 2012).

Los resultados de esta Tesis demuestran que ZDP y FPG intervienen en pasos consecutivos de la ruta de reparación de lesiones inducidas por agentes alquilantes e interaccionan entre sí (Figura 25). La interacción entre proteínas que participan en pasos consecutivos de una ruta de reparación puede verse acompañada de la estimulación de la que cataliza el paso precedente. Por ejemplo, ZDP procesa el producto generado por la ADN glicosilasa ROS1 y estimula su actividad (Martinez-Macias *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados mostrados en esta Tesis sugieren que la presencia de ZDP no estimula la actividad AP liasa de FPG (Figura 30). Mientras que la actividad de ZDP, al igual que la de su homólogo ZmDP2, es dependiente de magnesio (Betti *et al.*, 2001; Petrucco *et al.*, 2002), la actividad AP liasa es independiente de este ion (Hartwig, 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que tiene lugar una estimulación de la actividad AP liasa de la ADN glicosilasa bifuncional FPG en presencia de magnesio (Figura 30). Se ha descrito que el magnesio fomenta la disociación de algunas ADN glicosilasas de su sustrato, como la timina ADN glicosilasa humana (hTDG) (Waters *et al.*, 1999). No se puede descartar, por tanto, que el magnesio facilite la disociación de FPG del ADN, aumentando la tasa de recambio de la enzima. Por otra parte, los iones magnesio pueden solvataarse, permitiendo la formación de puentes de hidrógeno con el ADN y generando cambios conformacionales sobre el ADN dañado, que podrían favorecer al reconocimiento y la catálisis por parte de FPG (Sidorenko *et al.*, 2008; Subirana and Soler-Lopez, 2003). En cualquier caso, los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que el magnesio desempeña un papel modulador en la reparación de sitios AP mediante la ruta FPG/ZDP.

2. ARP no participa en la reparación de sitios AP generados por depurinación espontánea de N7-meG

A diferencia de hAPE1, ARP no procesa los sitios AP derivados de la depurinación espontánea de N7-meG, al menos no a niveles detectables (Figura 34). Este hecho puede explicar la importancia de la ruta dependiente de FPG/ZDP en la protección del genoma de *Arabidopsis* frente a MMS. El análisis genético demuestra que una deficiencia en ZDP basta para sensibilizar la planta al MMS (Figura 26), indicando que la ruta FPG/ZDP es la principal ruta de defensa frente a los efectos genotóxicos de este compuesto. Es importante señalar que para observar una sensibilidad similar a la de los mutantes simples *zdp*^{-/-} es necesaria una deficiencia simultánea de FPG y ARP (Figura 26), es decir, una inactivación concurrente de la vía de reparación dependiente de AP liasas y de la dependiente de AP endonucleasas. Por tanto, ARP parece desempeñar un papel secundario en la reparación de daños inducidos por MMS.

Aunque cuantitativamente secundario, el papel de ARP puede ser cualitativamente relevante. En particular, no puede descartarse que esta AP endonucleasa participe en la reparación de sitios abásicos generados por escisión enzimática de bases alquiladas catalizada por

alquilpurina ADN glicosilasas. De hecho, tanto la proteína ARP recombinante como los extractos de plantas mutantes *fpg*^{-/-} (donde la única actividad sobre sitios abásicos procede de ARP), son activos frente a sitios AP generados por escisión enzimática de N7-meG (Figura 34). Los experimentos realizados en esta Tesis no han permitido detectar actividad ADN glicosilasa sobre la propia N7-meG en extractos celulares de *Arabidopsis*. Sin embargo, su genoma codifica para dos homólogos de alquilpurina ADN glicosilasas monofuncionales que podrían escindir esta lesión: un homólogo de la ADN glicosilasa bacteriana AlkA (AT1G75230) y un homólogo de la ADN glicosilasa humana AAG, (AthAAG, AT3G120140) (Hays, 2002). Hasta la fecha, solo AthAAG ha sido caracterizada bioquímicamente (Santerre and Britt, 1994). El análisis de la secuencia aminoacídica de AthAAG mostró que los aminoácidos esenciales para la catálisis de hAAG están conservados (Hendershot and O'Brien, 2014; Hendershot *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2000). Sin embargo, a diferencia de hAAG, AthAAG escinde N3-meA pero no N7-meG (Santerre and Britt, 1994). No obstante, sería interesante estudiar la actividad enzimática de la proteína recombinante AthAAG sobre el oligonucleótido con N7-meG en una posición definida empleado en esta Tesis. En cualquier caso, los sitios AP generados por una alquilpurina ADN glicosilasa monofuncional serían también sustratos para FPG, gracias a su potente actividad AP liasa (Figura 27 y Figura 36).

La discriminación de ARP entre sitios AP enzimáticos y no enzimáticos merece un estudio detallado, ya que su homólogo en mamíferos, hAPE1, no realiza dicha distinción (Figura 35). ARP y hAPE1 pertenecen a la familia ExoIII de AP endonucleasas (Demple *et al.*, 1991) y presentan una identidad de secuencia del 57% en sus dominios catalíticos. Por otra parte, ambas proteínas poseen dominios N-terminales, ausentes en la proteína ExoIII de *E. coli*, de 61 residuos en hAPE1 y 270 en ARP (Gorman *et al.*, 1997). El dominio N-terminal de hAPE1 es necesario para su actividad redox y, aparentemente, es independiente de su actividad reparadora (Xanthoudakis *et al.*, 1992). A pesar del escaso grado de conservación de las secuencias N-terminales de ambas proteínas, ARP posee una función redox similar a la de hAPE1 (Babiychuk *et al.*, 1994b). El dominio redox de hAPE1 solapa parcialmente con el dominio reparador en una región con residuos conservados entre ARP y hAPE1 (Wilson and Barsky, 2001). No puede descartarse, por tanto, que las diferencias observadas entre ambas proteínas en el procesamiento de sitios AP de origen no enzimático sean debidas a las diferencias de secuencia en el dominio redox.

Los datos disponibles sobre el mecanismo de reconocimiento del sitio abásico por parte de las AP endonucleasas son escasos y, generalmente, circunscritos a hAPE1. Un análisis de secuencia realizado con multitud de AP endonucleasas puso de manifiesto la existencia de un bucle implicado en el reconocimiento del sitio AP (Lu *et al.*, 2012). Los residuos que conforman el bucle corresponden en ARP a las posiciones D396, Y487 y R488. El grado de conservación de dichos residuos permite clasificar a las diferentes AP endonucleasas en seis grupos distintos. En este análisis, ARP se agrupa junto a AP endonucleasas mayoritariamente

de origen procariótico (grupo 0), mientras que hAPE1 se enmarca en un grupo eminentemente eucariótico (grupo 3) (Lu *et al.*, 2012). Serán necesarios estudios adicionales para determinar si enzimas con bucles de reconocimiento diferentes discriminan o no entre sitios AP enzimáticos y no enzimáticos.

3. El origen del sitio AP influye en la elección entre SP-BER y LP-BER

Hasta la fecha, los factores que determinan la elección entre SP-BER y LP-BER no se conocen con exactitud. Sin embargo, se ha propuesto que el tipo de extremo 5' presente en los intermediarios de reparación es un factor clave (Fortini and Dogliotti, 2007). La aparición de este extremo viene determinada directamente por la ADN glicosilasa que lo genera y, por tanto, también por la lesión escindida (Fortini and Dogliotti, 2007). Así, en células de mamífero la reparación de hipoxantina o etenoadenina es llevada a cabo por la ADN glicosilasa monofuncional hAAG y por la AP endonucleasa hAPE1, generándose un hueco con un extremo bloqueante 5'-dRP. Este extremo es procesado mediante la actividad dRPasa de Pol β , permitiendo completar la reparación mediante la inserción de un desoxinucleótido (SP-BER). Sin embargo, la actividad dRPasa es normalmente limitante y la reparación también transcurre mediante el desplazamiento de la cadena con el extremo 5'-dRP y la inserción de varios desoxinucleótidos (LP-BER) (Fortini *et al.*, 1999). Esta segunda vía requiere la participación de otras proteínas como el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (*Proliferating cell nuclear antigen* o PCNA) y una *Flap* Endonucleasa (FEN1), que permite la eliminación de la cadena desplazada (Klungland and Lindahl, 1997). A diferencia de la reparación de hipoxantina o etenoadenina, la reparación de 8-oxoG es llevada a cabo por la ADN glicosilasa bifuncional Ogg1, que genera un hueco mononucleotídico con un extremo 5'-P. En este caso la ausencia del extremo 5'-dRP bloqueante favorece la inserción de un solo desoxinucleótido y por tanto la vía SP-BER (Fortini and Dogliotti, 2007). En definitiva, la idea generalmente aceptada es que las ADN glicosilasas funcionales favorecen una vía SP-BER, presumiblemente al generar un extremo 5'-P no bloqueante.

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis contradicen al menos parcialmente esta hipótesis. La reparación iniciada por la actividad AP liasa de FPG transcurre exclusivamente vía SP-BER cuando el sitio AP es de origen no enzimático, pero continua tanto vía SP- como LP-BER cuando su origen es enzimático. Puesto que en ambos casos se genera un extremo 5'-P, no parece que la naturaleza del extremo 5' sea el único factor que determine la elección entre SP o LP-BER. Existe la posibilidad de que la conformación del sitio abásico sea distinta dependiendo de su origen enzimático o no enzimático (Discusión, apartado 4) y que ello tenga un efecto sobre la facilidad con que FPG se disocia del producto de reacción, favoreciendo en cada caso el reclutamiento de proteínas diferentes para continuar la reparación. En cualquier caso, será necesario investigar en detalle la reparación de ambos

tipos de sitios AP por parte de FPG en extractos celulares para determinar si diferencias en la cinética de reparación pueden influir en la elección entre SP y LP-BER.

4. Posibles diferencias entre sitios AP enzimáticos y no enzimáticos

La incapacidad de ARP para procesar los sitios abásicos generados por depurinación de la N7-meG y el hecho de que los sitios AP producidos por hidrólisis espontánea y los generados por escisión enzimática sigan mecanismos de reparación diferenciados, sugiere la existencia de diferencias en la estructura química de los sitios AP dependiendo de su origen. La información disponible sobre las características químicas y los mecanismos de formación de sitios AP indican que la rotura, enzimática o no, del enlace N-glicosídico transcurre a través de un mecanismo de reacción que implica como intermediario un ion del tipo oxocarbenio (Drohat and Maiti, 2014; O'Brien and Ellenberger, 2003; Stivers and Jiang, 2003). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el caso de sitios AP no enzimáticos este tipo de análisis solo se ha realizado con dAMP, y no con ADN bicatenario (Drohat and Maiti, 2014).

Sin duda, la inestabilidad química de los sitios AP es uno de los mayores obstáculos en estudios bioquímicos y estructurales. Los sitios AP existen en un equilibrio de 4 especies, con aproximadamente un 99% de los anómeros en forma hemiacetal (α - y β -2-desoxi-D-ribofuranosa), mientras que solo un 1% está en forma de aldehído abierto o hidratado (Manoharan *et al.*, 1988; Wilde *et al.*, 1989) (Figura 3). La forma aldehído es propensa a rotura espontánea por β -eliminación, por lo que la mayor parte de los análisis bioquímicos, termodinámicos y estructurales se han llevado a cabo usando el análogo sintético tetrahidrofurano (THF), que carece de grupo hidroxilo en el C-1 de la 2-desoxirribosa (Takeshita *et al.*, 1987). Este análogo, resistente al procesamiento por AP liasas, probablemente no adopte la misma conformación que los sitios AP genuinos, ya sean estos de origen enzimático o no. Los modelos estructurales del THF unido a ADN revelan una conformación intrahelicoidal de la desoxirribosa (Lhomme *et al.*, 1999), mientras que la de los sitios AP generados enzimáticamente presentan conformaciones extrahelicoidales del anómero β (Goljer *et al.*, 1995) o de ambos anómeros (Hoehn *et al.*, 2001). Lamentablemente, no existen datos sobre la conformación adoptada por sitios AP de origen no enzimático. Aunque se han generado sitios AP en oligonucleótidos por depurinación térmica de purinas sin dañar (Vasseur *et al.*, 1991) o alquiladas (Coleman and Pires, 1999), no se han llevado a cabo estudios sobre su estructura.

Existe la posibilidad de que sitios AP enzimáticos y no enzimáticos presenten diferencias en las proporciones relativas de las distintas especies en el equilibrio. Dichas proporciones pueden ser relevantes puesto que aún no está claro si las AP endonucleasas son capaces de procesar los dos tipos de anómeros hemiacetálicos o sólo uno. Hay estudios que sugieren que hAPE1 sólo reconoce el anómero α , en base a la estructura del THF unido a esta enzima

(Mol *et al.*, 2000b). Sin embargo, análisis llevados a cabo con otros análogos sintéticos indican que hAPE1 puede reconocer ambos anómeros, aunque procese con mayor eficiencia el anómero α (de Los Santos *et al.*, 2004). Curiosamente, hay evidencias de que cuando la base huérfana es una citosina el único anómero presente es el β (Beger and Bolton, 1998), lo que sugiere que la base enfrentada al sitio AP puede influir en las proporciones relativas de ambos anómeros. Por otra parte, parece existir consenso en que la única forma que reconocen las AP liasas es la forma aldehído (Castaing *et al.*, 1999). Por tanto, las posibles diferencias en el equilibrio entre las cuatro especies que conforman los sitios AP enzimáticos y no enzimáticos podrían afectar al su posterior procesamiento por parte de AP endonucleasas y AP liasas.

Otra posible diferencia entre los sitios AP enzimáticos y no enzimáticos es la conformación del azúcar. La desoxirribosa en el ADN no presenta una conformación plana, sino que adopta una estructura en forma de "sobre" con ambas solapas abiertas, en la que cuatro carbonos se encuentran prácticamente en el mismo plano y un quinto (el C'2 o el C'3) desplazado fuera de dicho plano y hacia el mismo lado que el C5. Ello da lugar a dos posibles conformaciones denominadas C'2 endo y C'3 endo, respectivamente (Altona and Sundaralingam, 1972; Williams *et al.*, 2009). Se ha descrito que algunas ADN glicosilasas pueden modificar la conformación de la desoxirribosa durante la catálisis. Por ejemplo, la uracil ADN glicosilasa humana reconoce el uracilo y lo orienta hacia fuera, distorsionando a la vez el plegamiento natural de la desoxirribosa del ADN-B de una conformación C'2 endo a C'3 exo, favoreciendo la rotura del enlace N-glicosídico (Parikh *et al.*, 2000). Aunque una vez liberada la base el sitio AP vuelve a la conformación original C'2 endo, se desconoce cuál es la vida media de la conformación C'3 exo alterada. A diferencia de la escisión enzimática del uracilo, no se han descrito cambios en la conformación C'2 endo de la desoxirribosa durante la liberación no enzimática de bases. Por lo tanto, es posible que los sitios enzimáticos y no enzimáticos difieran en las proporciones relativas de distintas conformaciones de la desoxirribosa.

En definitiva, los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que existen diferencias estructurales aún por identificar entre los sitios AP enzimáticos y no enzimáticos, y apuntan a la necesidad de análisis comparativos detallados de ambos tipos de sitios abásicos para entender sus posibles consecuencias biológicas.

5. La base huérfana desempeña un importante papel en el procesamiento de sitios AP de origen enzimático

Los resultados obtenidos en esta Tesis también ponen de manifiesto la importancia de la base huérfana en el procesamiento de los sitios abásicos generados enzimáticamente. La principal AP endonucleasa de *Arabidopsis*, ARP, tanto en su versión recombinante como en

su versión nativa, muestra una clara preferencia por purinas enfrentadas al sitio abásico (Figura 36C y D). En un estudio anterior ya se había descrito que ARP es necesaria para la reparación de uracilo mediada por la enzima UNG de *Arabidopsis* (Cordoba-Cañero *et al.*, 2011). Por tanto, es posible que ARP haya evolucionado para procesar sitios abásicos procedentes de la escisión enzimática del uracilo, ya provenga de la desaminación de la citosina (U:G) o de la inserción errónea de dUTP frente a adenina (U:A). También es posible que ARP procese sitios AP generados tras la escisión de timina originada por desaminación de 5-metilcitosina (T:G) por parte de MBD4L (Ramiro-Merina *et al.*, 2013).

La base opuesta también influye en la actividad de la principal AP liasa de *Arabidopsis*, FPG. En *Arabidopsis*, la reparación de 8-oxoG:C recae sobre FPG y OGG1 (Córdoba-Cañero *et al.*, 2014). La preferencia de FPG por sitios AP:C (Figura 36A y B), análoga a la de su ortólogo EcoFpg (Tchou *et al.*, 1994), refuerza la idea de que ambas enzimas han evolucionado para catalizar la eliminación de guaninas oxidadas enfrentadas a citosina. Los resultados obtenidos en esta Tesis fortalecen la idea de que, en el caso de ADN glicosilasas bifuncionales, la influencia de la base opuesta a la lesión no sólo afecta a la actividad glicosilasa sino también a la AP liasa.

Conclusiones

1. FPG es la principal AP liasa de *Arabidopsis* y desempeña un papel esencial en la respuesta de la planta al MMS, ya que inicia la reparación de los sitios abásicos procedentes de la pérdida espontánea de N7-meG.
2. Dicha reparación es independiente de AP endonucleasas, puesto que la incisión catalizada por FPG genera un intermediario con un extremo 5'-P y un extremo 3'-P bloqueante que es hidrolizado a 3'-OH por la actividad ADN 3'-fosfatasa de ZDP.
3. Existen diferencias aún por identificar entre sitios AP enzimáticos y no enzimáticos ya que ARP, la principal AP endonucleasa de *Arabidopsis*, procesa sitios AP procedentes de la escisión enzimática de N7-meG pero no aquellos generados por su depurinación espontánea.
4. Los sitios AP enzimáticos y no enzimáticos tienen distinta probabilidad de ser reparados a través de *short-patch* BER o vía *long-patch* BER.
5. La base huérfana opuesta a un sitio AP enzimático influye en la eficiencia con el que es procesado por la AP liasa FPG y por la AP endonucleasa ARP.

Materiales y métodos

1. Material biológico

1.1. Plantas

Las líneas de *Arabidopsis* empleadas en esta Tesis se detallan a continuación. Todas las líneas empleadas pertenecen al ecotipo Columbia.

Tabla 3. Líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* empleadas.

Mutante	Observaciones
<i>arp</i> ^{-/-}	Línea mutante en el gen <i>arp</i> por inserción de ADN-T (SALK_021478), previamente caracterizada en nuestro grupo (Córdoba-Cañero <i>et al.</i> , 2011). Suministrada por el <i>Arabidopsis Biological Resource Center</i> (ABRC).
<i>zdp</i> ^{-/-}	Línea mutante en el gen <i>zdp</i> por inserción de ADN-T (SAIL_60_C08), previamente caracterizada en nuestro grupo (Martínez-Macías <i>et al.</i> , 2012). Suministrada por el <i>Arabidopsis Biological Resource Center</i> (ABRC).
<i>fpg</i> ^{-/-}	Línea mutante en el gen <i>fpg</i> por inserción de ADN-T (SALK_076932). Suministrada por el <i>Arabidopsis Biological Resource Center</i> (ABRC).
<i>fpg</i> ^{-/-} <i>zdp</i> ^{-/-}	Generado en esta Tesis a través del cruzamiento de los respectivos mutantes simples.
<i>fpg</i> ^{-/-} <i>arp</i> ^{-/-}	Generado en esta Tesis a través del cruzamiento de los respectivos mutantes simples.

1.2. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *E. coli* empleadas se detallan a continuación:

Tabla 4. Cepas bacterianas.

Cepa	Genotipo	Observaciones
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacZΔM15</i>) <i>hsdR17, recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>relA1</i>	Cepa receptora utilizada en la clonación de fragmentos de DNA y en la propagación de plásmidos. La mutación Φ80 <i>lacZΔM15</i> permite la α-complementación con el extremo amino terminal de la β-galactosidasa, codificada en los vectores pUC y sus derivados (Hanahan, 1983).
XL1-Blue	<i>supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> <i>lacZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Cepa receptora utilizada en la clonación de fragmentos de ADN y en la propagación de plásmidos. La mutación Φ80 <i>lacZΔM15</i> permite la α-complementación con el extremo amino terminal de la β-galactosidasa, codificada en los vectores pUC y sus derivados (Hanahan, 1983). Resistente a tetraciclina.
BL21 (DE3) CodonPlus	F ⁻ <i>dcm⁻ ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B</i>) gal λ(DE3) Hte [<i>argU, ileY,</i> <i>leuW, Cam^r</i>]	Cepa empleada para obtener altos niveles de expresión de genes que contienen codones poco frecuentes en <i>E. coli</i> y se sitúan bajo el control del promotor del bacteriófago T7. Expresa los ARNt correspondientes a 4 codones de uso frecuente en eucariotas pero raros en <i>E. coli</i> (AUA, AGG, AGA, CUA) (Bennett <i>et al.</i> , 2004). Resistente a cloranfenicol y tetraciclina.

1.3. Vectores de clonación

Para subclonar el ADNc de *FPG*, se empleó el vector pET28b, que permite altos niveles de expresión de proteínas o péptidos en *E. coli*. Para facilitar el proceso de purificación posterior, este vector permite la fusión de 6 residuos de histidina a la proteína de interés.

2. Medios de cultivo

2.1. Cultivo bacteriano

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (120 °C, 20 min) o mediante filtración.

•Medio Luria-Bertani (LB): para el crecimiento de *E. coli*.

Líquido: bacto triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l) y NaCl (5 g/l).

Sólido: se añade bacto agar (15 g/l) a la mezcla anterior previamente disuelta.

•Medio PSI-b: para la preparación de células competentes. Compuesto por: bacto triptona (20 g/L), extracto levadura (5 g/L), NaCl (0,6 g/l), KCl (0,185 g/L); ajustar el pH a 7. Después de esterilizar en autoclave se añade MgSO₄ (10 mM).

2.2. Cultivo de *Arabidopsis*

Medios estériles

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (120 °C, 20 min).

•Medio *Murashige and Skoog* (MS, Sigma*) con sacarosa: medio nutritivo para la siembra de semillas en placas de Petri. Compuesto por: MS (4,4 g/l), sacarosa (30 g/l), agar de plantas (8 g/l); ajustar pH a 5,8 (con KOH).

**Se indican sólo las casas comerciales o modelos de aparatos que puedan ser relevantes.*

Medios no estériles

Para el crecimiento de *A. thaliana* en condiciones no estériles se utilizó como sustrato una mezcla comercial de turba y perlita (Compo Sana®, Compo).

3. Cultivo y crecimiento de organismos

3.1. Cultivo y crecimiento de bacterias

E. coli se cultivó en placas de Petri con medio LB sólido, o en medio líquido en matraces o tubos de ensayo con medios de cultivo apropiados y agitación a 250 rpm. La temperatura de incubación fue de 37 °C.

La conservación de las estirpes bacterianas durante largos periodos se llevó a cabo a -80 °C en medio LB líquido con glicerol (15 %, v/v). Para periodos cortos, se mantuvieron a 4 °C en medio LB sólido.

3.2. Cultivo y crecimiento de plantas

3.2.1. Cultivo de plantas en maceta

El crecimiento de *A. thaliana* se llevó a cabo en macetas con sustrato Compo Sana®. En cada maceta se dispensó sustrato hasta una altura de unos 4 cm y se compactó. Seguidamente se añadió agua y se rellenó con sustrato hasta el borde de la maceta sin compactar demasiado. De nuevo se humedeció y se sembraron las semillas. A continuación, las macetas se cubrieron con plástico transparente con algunas perforaciones. Con el fin de sincronizar la germinación de las semillas, las macetas se incubaron a 4 °C durante 48 h. Tras este tiempo, se colocaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, 16 h de luz, 8 h de oscuridad) a una temperatura de 23 ±1 °C. Transcurrida una semana (o tras la aparición de los cotiledones), se retiró el plástico y se incubaron en las mismas condiciones hasta que alcanzaron la fase de desarrollo deseada.

Las plantas se regaron mediante subirrigación con agua de grifo cada dos días. Cuando las plantas dejaron de producir flores, la irrigación se suspendió y se dejaron secar en sobres de papel. Las semillas se recogieron y se tamizaron con coladores convencionales. Su conservación se realizó a temperatura ambiente, en tubos eppendorf cerrados.

3.2.2. Cultivo de plantas en placas de Petri

Previamente a la siembra, las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en etanol (100 %, v/v) y agitándolas durante 1 min. A continuación, se retiró el etanol y se añadió lejía (50 %, v/v), manteniéndolas en agitación durante 10 min. Por último, se realizaron 4 lavados consecutivos de 5 min cada uno con agua desionizada estéril.

Las semillas se dispensaron en placas de Petri con medio MS con (Materiales y métodos, apartado 2.2). Las placas se sellaron con cinta de parafina y se incubaron en una cámara con tubos fluorescentes (36 W, 16 h de luz, 8 h de oscuridad) a una temperatura de 23 ± 1 °C durante 15 días. Tras este periodo las plántulas se recogieron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.3. Cruzamientos genéticos de *Arabidopsis*

Para la realización de cruzamientos genéticos se sembraron de 5 a 7 semillas por maceta de mutantes *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-} y *zdp*^{-/-}. Posteriormente, se seleccionaron las inflorescencias que se emplearían como parentales femeninos, y se eliminaron las silicuas, flores maduras y aquellas en las que los pétalos empezaran a ser visibles, mediante un fórceps y ayuda de unos binoculares 20x. A continuación, se eliminaron algunas yemas florales, dejando únicamente las 3-5 yemas de mayor tamaño. A estas yemas se les extirparon los sépalos, pétalos y las anteras inmaduras, dejando intacto el ovario. La yema se descartó en caso de encontrar anteras maduras.

Las inflorescencias con flores emasculadas se marcaron y las plantas se trasladaron a la cámara de crecimiento. Tras 48 h, aquellos ovarios que permanecieron viables tras la emasculación se fecundaron frotando su estigma con las anteras de flores maduras de la planta a utilizar como parental masculino. Después de 15 a 25 días en la cámara de crecimiento se recogieron las silicuas con las semillas híbridas, antes de que éstas maduraran por completo y se abrieran. Las silicuas se guardaron en tubos eppendorf y se mantuvieron a temperatura ambiente durante unos días hasta su completa maduración. Tras esto, las semillas de la F1 fueron germinadas y crecidas en macetas. Se genotipó la F1 para seleccionar los individuos heterocigotos mediante PCR (Materiales y métodos, apartados 5.2 y 7) con los cebadores adecuados (Tabla 5). Posteriormente se genotipó la F2 para seleccionar los individuos *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} y *fpg*^{-/-} *zdp*^{-/-}.

3.4. Estudio de la sensibilidad a genotóxicos

Las semillas se esterilizaron (Materiales y métodos, apartado 3.2.2) y se sincronizaron a 4 °C durante 48 h. Se sembraron 15-20 semillas de cada genotipo en placas Petri (10 cm de diámetro) distribuidas en sectores radiales sobre medio MS con sacarosa, agar y distintas cantidades de metil metanosulfonato (50 y 70 ppm, Sigma), camptotecina (50 y 200 nM, Sigma) y menadiona (50 y 100 µM, MP Biomedicals).

Se incubaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, 16 h de luz, 8 h de oscuridad) a una temperatura de 23 ± 1 °C. Tras dos semanas de crecimiento, se obtuvo una imagen de las placas mediante escáner y se analizaron los resultados.

4. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones de amplificación y/o secuenciación, se diseñaron con la ayuda del programa Oligo 7.0 y Vector NTI, analizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de dímeros y horquillamientos no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos (T_m , T_d , %G+C, %A+T). Se obtuvieron comercialmente de la compañía Isogen.

4.1. Cebadores empleados para el genotipado de plantas

Tabla 5. Cebadores para el genotipado de plantas.

Nombre	Secuencia (5'-3')	T_m (°C)
FPG_F1	AACGAAGCAATAAAAGGCGC	60
FPG_F5	CCACTCCTCTGAGTCCTTTACAGC	60
ARP_F1	GAACTTATCTCAACTTTACGAC	60
ARP_R1	GCTCTCAAACCTCAACAATCC	60
ZDP_F1	AATGAATCCAACATTGATCGATGGAAG	58
ZDP_R1	ATACAGCTAAGTCCCTGGCGATGTACTT	58
LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	58
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	60

4.2. Oligonucleótidos usados para la preparación de sustratos de ADN

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la preparación de sustratos de ADN.

Nombre ^a	Secuencia (5'-3') ^b
FI-28G	TCACGGGATCAATGTGTTCTTTTCAGCTG
FI-28G (P)	TCACGGGATCAATGTGTTCTTTTCAGCTG (3' -P)
FI-GUCCRnoC	TCACGGGATCAATGTGTTCTTTTCAGCTG <u>U</u> CCTCACTCTCACCATCAATACC
GGCCRnoC	GGTATTGATGGTGAGAGTGAGG <u>CC</u> CAGCTGAAAGAACACATTGATCCCGTGA
GGGCCRnoC	GGTATTGATGGTGAGAGTGAGG <u>GG</u> CAGCTGAAAGAACACATTGATCCCGTGA
FI-GGCCF	TCACGGGATCAATGTGTTCTTTTCAGCTG <u>GC</u> CCTCACGCTGACCAGGAATACC
GGCCR	GGTATTCCTGGTCAGCGTGAGG <u>CC</u> CAGCTGAAAGAACACATTGATCCCGTGA

^a FI: marcaje con fluoresceína en el extremo 5'.

^b U: uracilo. Las bases subrayadas señalan las bases cercanas a la lesión de estudio, señalada en rojo. En azul se señala la base opuesta en la cadena complementaria.

4.3. Otros cebadores

Los cebadores T7 *promoter* (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y T7 *terminator* (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') se emplearon en la secuenciación de la construcción pET28b-FPG y corresponden a secuencias presentes en el vector de expresión pET28b.

5. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

5.1. Aislamiento de ADN plasmídico

Miniprep método CTAB

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Murray y Thompson (Murray and Thompson, 1980) con algunas modificaciones.

Se partió de un cultivo estacionario de la estirpe portadora del plásmido crecido en 5-10 ml de medio LB con la selección apropiada. Se centrifugaron 3-10 ml de este cultivo durante 2 min a 13.000 rpm, y las células se resuspendieron en 200 µl de STET*. A continuación, se añadieron 4 µl de lisozima (50 mg/ml) y 2 µl de ARNasa (10 mg/ml), y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente la muestra se calentó a 100 °C durante 45 s y se centrifugó 10 min a 13.000 rpm. Los restos celulares de aspecto mucoso se retiraron con un palillo estéril, se añadieron 10 µl de CTAB** y se incubó 5-10 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 5 min a 13.000 rpm se desechó el sobrenadante y el ADN se resuspendió en 300 µl de NaCl (1,2 M). Se añadieron 750 µl de etanol frío puro y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron las muestras durante 10 min a 13.000 rpm y el precipitado obtenido se lavó con etanol al (70 %, v/v), se secó mediante centrifugación en vacío (*Speed-Vac*) y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada estéril.

*STET: sacarosa (8 %, p/v); Tritón X-100 (0,1 %, v/v); EDTA (50 mM); Tris-HCl pH 8,0 (50 mM).

**CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio (5 %, p/v).

Miniprep con PerfectPrep Spin Mini Kit (5 PRIME)

La purificación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (5 PRIME). El procedimiento está basado en una lisis alcalina, seguida de la unión del ADN plasmídico a una matriz de sílice y su posterior elución en condiciones apropiadas de pH y concentración salina.

5.2. Aislamiento de ADN genómico de *Arabidopsis*

Extracción de ADN para PCR de genotipado

Una muestra de tejido procedente de una hoja de roseta se introdujo en un tubo eppendorf junto con 400 µl de tampón de extracción II*. El tejido homogeneizado con ayuda de un micropistilo para tubos eppendorf se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Se transfirieron 300 µl de ese sobrenadante a un nuevo tubo y el ADN se precipitó añadiendo 300 µl de isopropanol e incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min el precipitado se lavó dos veces con etanol al (70 %, v/v). Por último, el ADN se secó por centrifugación en vacío (*Speed-Vac*) y se resuspendió en 20-25 µl de agua desionizada estéril.

**Tampón de extracción II*: Tris-HCl pH 7,5 (200 mM); NaCl (250 mM); EDTA (25 mM); SDS (0,5 %, p/v).

6. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos

6.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción empleadas en la construcción de pET28b-FPG fueron *XhoI* (2 U) y *XbaI* (1 U) (New England Biolabs, NEB). Los tratamientos enzimáticos se llevaron a cabo en las condiciones recomendadas por la casa comercial.

6.2. Desfosforilación

La desfosforilación de plásmidos linearizados, previa a la ligación con el inserto correspondiente, disminuye drásticamente la frecuencia de reacciones intramoleculares y, por tanto, el número de plásmido sin inserto que se obtienen tras la ligación. La reacción se llevó a cabo usando fosfatasa alcalina de gamba (1 U, *shrimp alkaline phosphatase*, SAP, Roche) por cada 50 ng de plásmido linearizado en el tampón aportado por la casa comercial e incubando a 37 °C durante 1 h. Posteriormente la enzima se inactivó calentando a 65 °C durante 15 min.

6.3. Ligación de fragmentos de ADN a vectores plasmídicos

La unión de fragmentos de ADN a vectores linearizados se llevó a cabo utilizando la ADN ligasa del fago T4 (1 U, Promega), en reacciones de 15 µl durante 18 h a 16 °C, siguiendo las indicaciones del fabricante.

7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se empleó para la detección de las inserciones de ADN-T en los genes de interés. Se emplearon normalmente tres cebadores en la misma mezcla de reacción: dos homólogos a la región genómica que flanquea la inserción de ADN-T, para la amplificación del alelo silvestre, y uno homólogo al ADN-T para la amplificación, junto con uno de los cebadores de la región genómica, del alelo mutante.

La reacción se realizó con 1,5 pmol/ μ l de cada cebador (Tabla 5), $MgCl_2$ (4 mM, Bioline), dNTPs (0,2 mM, Sigma) y ADN polimerasa Taq (0,15 U/ μ l, Bioline). Como molde se usaron 2 μ l de ADN obtenido según el protocolo de extracción de ADN para PCR de genotipado (Materiales y métodos, apartado 5.2). Las condiciones de la PCR se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones estándar de PCR.

Etapas	Temperatura^a	Tiempo^b	Nº de ciclos^c
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	N
Unión al cebador	T _{un}	30 s	
Extensión	72 °C	T _{ext}	
Extensión final	72 °C	7 min	1
	16 °C	Indefinido	

^a T_{un} es la temperatura de unión de los cebadores al molde.

^b T_{ext} el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 min por cada kb de producto.

^c N normalmente es 35 para ADN genómico.

8. Electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas

8.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (CONDA, Pronadisa) disuelta en tampón TAE*, al 1 % (p/v) de agarosa. Para poder visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) a la solución de agarosa fundida. Cada muestra se mezcló con tampón de carga para geles de agarosa** en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm. Los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak modelo DC290. La iluminación inferior procedía de un transiluminador de luz ultravioleta (Modelo TCX, Vilber Lourmat). Como patrón de peso molecular se emplearon diversas mezclas comerciales de fragmentos de ADN de peso molecular conocido. La concentración de ADN se determinó

midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000).

**Tampón TAE*: Tris-acetato (40 mM, Trizma-base y ácido acético glacial); EDTA pH 8,0 (1 mM).

***Tampón de carga para geles de agarosa*: azul de bromofenol (0,25 %, p/v); azul de xilencianol (0,25 %, p/v); sacarosa (40 %, p/v) en 5x TAE.

Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN se realizó usando el kit *QIAquick Gel Extraction* de Qiagen, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las soluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y pH adecuados para la unión del ADN a una membrana de sílice, y su posterior elución en condiciones básicas.

8.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Para la caracterización de las proteínas purificadas y de los extractos celulares de *A. thaliana* se realizaron diversos ensayos, cuyos productos de reacción se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con urea*. Tras verter la mezcla entre los dos cristales, se introdujo el peine, y se dejó polimerizar durante toda la noche. En función de los intermediarios de reparación esperados y de la resolución requerida se emplearon geles de 20 o 40 cm de longitud. Las muestras se prepararon añadiendo tampón de carga desnaturalizante**, se calentaron a 50 o 95 °C durante 5 min y se aplicaron en los pocillos correspondientes. La electroforesis se llevó a cabo en tampón 1x TBE a un voltaje constante de 500 voltios para los geles de 20 cm, o de 1.300-1.500 V para los geles de 40 cm de longitud. Previamente a la carga de las muestras, los geles se precalentaron mediante electroforesis en las mismas condiciones anteriores durante al menos 2 h.

**Geles desnaturalizantes de poliacrilamida con urea*: urea (7 M, Merck), 12 % poliacrilamida (solución 40% Acrilamida: Bis 19:1 Bio-Rad) en 1x TBE. La polimerización se inició añadiendo 300 µl de persulfato de amonio (10 %, p/v, APS) y 30 µl de N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED).

***Tampón 1x TBE*: Tris (90 mM, Trizma Base); ácido bórico (90 mM); EDTA pH 8,0 (0,2 mM).

****Tampón de carga desnaturalizante*: formamida (90%, v/v); 1x TBE (10 %).

8.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación e identificación de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, *S*odium *d*odecyl *s*ulfate-*p*olyacrilamide *g*el *e*lectroforesis) (Laemmli, 1970).

Preparación de un gel al 10%

•Gel separador (5 ml): se mezclaron 1,25 ml de solución LGB* (*Lower Gel Buffer*), 1,2 ml de 40 % Acrilamida: Bis 37,5:1 (Bio-Rad) y 2,5 ml de agua. La polimerización se inició añadiendo 30 µl de APS (10 %, p/v) y 10 µl de TEMED.

•Gel concentrador (5 ml): se mezclaron 1,25 ml de solución UGB** (*Upper Gel Buffer*), 0,5 ml de 40 % Acrilamida: Bis 37,5:1 (Bio-Rad) y 3,25 ml de agua. Para permitir la polimerización se añadieron 30 µl de APS (10 %, p/v) y 10 µl de TEMED.

*LGB: Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M); SDS (0,4 %, p/v).

**UGB: Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M); SDS (0,4 %, p/v).

Tratamiento de las muestras

Las muestras a analizar se mezclaron con tampón de carga para proteínas*, se desnaturalizaron durante 10 min a 95 °C, se centrifugaron 5 min a 13.000 rpm y se cargaron en el gel SDS-PAGE.

*Tampón de carga para proteínas: Tris-HCl pH 6,8 (50 mM); glicerol (8 %, v/v); SDS (1,6 %, p/v); β-mercaptoetanol (4 %); azul de bromofenol (0,1 %, p/v).

Electroforesis

La electroforesis se realizó en tampón Tris-Glicina* a 80 V hasta que el frente pasó al gel separador, en el que se cambió a un voltaje constante de 180 V, en el sistema vertical *Mini Protean cell* de Bio-Rad.

*Tampón Tris-Glicina: Tris (25 mM, Trizma base); glicina (192 mM); SDS (0,1 %, p/v), pH 8,3.

Tinción

Los geles se tiñeron con Solución de Coomassie*. Para eliminar el exceso de tinción se lavaron con *High Destain*** durante al menos 30 min y con *Low Destain**** durante al menos 1 h.

*Solución de Coomassie: Coomassie Blue (0,2 %, p/v, *brilliant blue* R-250); metanol (55 %, v/v); ácido acético (9 %, v/v).

**High Destain solution: metanol (50 %, v/v); ácido acético (10 %, v/v).

***Low Destain solution: metanol (5 %, v/v); ácido acético (7 %, v/v).

9. Transformación de *E. coli*

9.1. Preparación de células competentes

Una colonia fresca de *E. coli* (DH5 α o XL1-Blue) se inoculó en 5 ml de PSI-b y se incubó toda la noche con agitación a 37 °C. Todo el cultivo estacionario se transfirió a 100 ml de PSI-b en un matraz de 1 L (precalentado a 37 °C) y se continuó la incubación con agitación vigorosa hasta que la DO₆₀₀ fue 0,45-0,5. A continuación el cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó durante 5 min a 6.000 rpm y 4 °C. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 ml de solución Tfb-1* fría. Tras una incubación de 5 min en hielo se volvieron a centrifugar durante 5 min a 6.000 rpm y 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 ml de solución Tfb-2** fría. Por último, esta suspensión celular se incubó en hielo durante 15 min, se distribuyó en alícuotas de 100 μ l y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

*Solución Tfb-1: acetato potásico pH 6,9 (30 mM); MnCl₂ (50 mM); KCl (100 mM); CaCl₂ (100 mM); glicerol (15 %, v/v). Esterilizar por filtración.

**Solución Tfb-2: MOPS pH 7,0 (10 mM); CaCl₂ (75 mM); KCl (10 mM); glicerol (15 %, v/v). Esterilizar por filtración.

9.2. Transformación de células competentes

A 50 μ l de células competentes, previamente descongeladas en hielo, se añadieron 5 μ l de ADN o de mezcla de ligación y se incubaron 30 min en hielo. Transcurrido ese tiempo, las células se sometieron a un choque térmico de 30 s a 42 °C e inmediatamente se volvieron a dejar en hielo durante 5 min. Para permitir la expresión del gen de resistencia a kanamicina, las células transformadas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h a 37 °C con 1 ml de LB. Por último, toda la mezcla de transformación se sembró en placas con medio selectivo que se incubaron a 37 °C durante 16 h.

9.3. Protocolo de transformación "rápida" de *E. coli*

Este protocolo se utilizó para la transformación de la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus. Se partió de un cultivo bacteriano crecido en medio LB líquido hasta estado estacionario y se reinoculó transfiriendo 50 μ l del mismo a 5 ml de medio LB fresco y se continuó la incubación con agitación a 37 °C hasta que la DO₆₀₀ fue 0,5-0,8. Una vez alcanzada la densidad adecuada, se recogieron 3 ml del cultivo mediante centrifugación (13.000 rpm durante 5 minutos) a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron en 500 μ l de CaCl₂ (0,1 M), y se incubaron en hielo durante 5 min. De nuevo las bacterias se centrifugaron

como en el paso previo y, tras retirar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron nuevamente en 50 µl de CaCl₂ (0,1 M), y se incubaron 5 min en hielo. La transformación se realizó añadiendo 1 µl de la solución que contenía el ADN (de 10 a 100 ng) e incubando en hielo durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se realizó un choque térmico de 2 min a 42 °C e inmediatamente se volvieron a dejar en hielo durante 5 min. Posteriormente se añadió 200 µl de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1 h. A continuación, se sembraron en placas de medio selectivo y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

10. Expresión y purificación de proteínas en *E. coli*

10.1. Expresión y purificación de FPG

La construcción pET30b-FPG, cedida por Scott Kathe (Kathe *et al.*, 2009), se digirió con las enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I, con el fin de subclonar el ADNc de *AthFPG* en el vector pET28b. La estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus se transformó con la construcción pET28b-FPG, siguiendo el protocolo de transformación “rápida” de *E. coli* (Materiales y métodos, apartado 9.3). El ADNc se sitúa bajo el control del promotor del fago T7, cuya ARN polimerasa permite la expresión selectiva e inducible de genes en *E. coli* (Studier *et al.*, 1990). Se obtiene así una proteína recombinante, His-FPG, con seis residuos de histidina añadidos en tándem a su extremo carboxilo-terminal. Esto permite que todas las proteínas purificadas sean de productos de traducción completos. La purificación se llevó a cabo mediante el empleo de cromatografía de afinidad altamente específica usando columnas de sefarosa HisTrap™ HP (Amersham Biosciencias) que contienen Ni²⁺-Sefarosa™ de alta resolución.

Las condiciones para la expresión de la proteína recombinante His-FPG fueron las siguientes: una colonia transformante fresca se inoculó en 10 ml de LB con kanamicina (30 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) y se creció a 37 °C durante toda la noche con agitación hasta alcanzar estado estacionario. Una alícuota de 2,5 ml de este cultivo se reinoculó en 250 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37 °C con agitación hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 0,1. El cultivo se incubó entonces a 23 °C y se prolongó la incubación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6, momento en el que se añadió isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG, a una concentración 1 mM final), con el fin de inducir la expresión de la proteína. Transcurridas 2 h de inducción, las células se recogieron centrifugando a 13.000 rpm durante 30 min a 4 °C y se congelaron a -80 °C.

Los *pellets* bacterianos, previamente descongelados en hielo, se resuspendieron en 5 ml de Solución de Sonicación* (SB) suplementada con 5 mM imidazol y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma), se rompieron mediante sonicación. Los restos celulares se eliminaron

centrifugando a 4 °C durante 30 min a 8.000 rpm. La purificación se llevó a cabo utilizando el sistema de cromatografía ÄKTA Prime (Amershan Biosciences) inyectando la muestra en una columna Ni²⁺-Sefarosa (GE Healthcare) preequilibrada con SB1 suplementado con 5 mM de imidazol. El lisado bacteriano se filtró usando membranas de un tamaño de poro de 0,45 µm y se inyectó en la columna. Las proteínas se eluyeron en SB suplementado con imidazol en un gradiente de 60 mM a 1 M imidazol. Todo el proceso se realizó a un flujo constante de 1 ml/min a 4 °C. Las proteínas eluidas se recogieron en fracciones de 0,5 ml y una alícuota de cada fracción se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) (Materiales y métodos, apartado 8.3). Aquellas que presentaban una única banda correspondiente a la proteína recombinante fueron mezcladas y dializadas durante 1 h frente Solución de Diálisis (SD)** y durante toda la noche frente a SD suplementado con glicerol al 50 %. Esta preparación se distribuyó en alícuotas, y se congeló a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford utilizando soroalbúmina bovina (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

*Solución de Sonicación (SB): Tris-HCl pH 8,0 (20 mM); NaCl (50 mM); glicerol (20 %, v/v); β-mercaptoetanol (15 mM); Tween-20 (1 %, v/v).

**Solución de Diálisis (SD): Tris-HCl pH 8,0 (50 mM); NaCl (500 mM); DTT (1 mM).

10.2. Expresión y purificación de otras proteínas.

MBP-ZDP o His-ZDP se obtuvieron como se ha descrito previamente (Martinez-Macias *et al.*, 2012). La expresión y purificación de His-ARP se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Li *et al.*, 2015).

11. Aislamiento de extractos celulares de la planta

Para la obtención de extractos celulares de *A. thaliana* se crecieron plántulas durante 15 días en placas de Petri (Materiales y métodos, apartado 2.2). Posteriormente, se machacaron 500 mg del tejido vegetal de las diferentes estirpes en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se resuspendió en 1 ml de solución de extracción* con inhibidores de proteasas específicos de plantas (Calbiochem) y se incubó en hielo al menos durante 30 min. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante se filtró con un monodur de 20 µm y se dializó frente a solución de diálisis de extractos** durante toda la noche. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Bradford utilizando soroalbúmina bovina (BSA, Sigma) como estándar (Bradford, 1976).

*Solución de extracción: HEPES KOH pH 7,8 (25 mM); KCl (100 mM); MgCl₂ (5 mM); sacarosa (250 mM); glicerol (10 %, v/v); DTT (1 mM).

****Solución de diálisis de extractos:** HEPES KOH pH 7,8 (25 mM); KCl (100 mM); glicerol (17 %, v/v); DTT (2 mM).

12. Análisis de la actividad enzimática

12.1. Hibridación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados para preparar los sustratos ADN (Tabla 6) fueron purificados mediante PAGE (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) y adquiridos en IDT. Para la obtención de sustratos de doble cadena, 5 μ M de un oligonucleótido marcado con fluoresceína en el extremo 5' se mezcló en una solución de Tris-HCl pH 8,0 (10 mM) y NaCl (20 mM) con 10 μ M del oligonucleótido complementario correspondiente, no marcado, en un volumen final de 5 μ l. Para la correcta hibridación de ambos oligonucleótidos, la mezcla se calentó a 95 °C durante 5 min y se dejó enfriar lentamente hasta que alcanzó la temperatura ambiente.

12.2. Preparación de los sustratos de ADN

Síntesis de un sustrato de ADN con N7-meG en una posición definida

El oligonucleótido bicatenario que contiene un solo residuo de N7-meG se sintetizó usando el método de extensión con cebadores (Asaeda *et al.*, 2000). Así, se usó un oligonucleótido marcado en 5' (FI-28G) de 28 residuos que se anilló a un oligonucleótido de 51 residuos (Tabla 6). La síntesis de ADN se realizó extendiendo 200 nM de dicho heterodúplex en una reacción que contiene 0,1 U/ μ l del fragmento Klenow (3' \rightarrow 5' exo^- , NEB) 20 μ M dCTP, 20 μ M dATP, 20 μ M dTTP y 200 μ M de N7-metil-dGTP (Jena Bioscience) a 37 °C durante 1 h en NEBuffer™ 2 en un volumen final de 100 μ l. El sustrato control se sintetizó con 20 μ M dGTP en lugar de N7-metil-dGTP. Las reacciones se detuvieron añadiendo 10 mM EDTA y el ADN se precipitó con etanol a -20 °C en presencia de NaCl (0,3 mM) y de glicógeno (16 μ g/ml). Las muestras se resuspendieron en 25 μ l de agua desionizada y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Síntesis un sustrato de ADN con me-FAPy-G en una posición definida

La conversión del residuo N7-meG en su forma abierta, me-FAPy-G, se realizó incubando el sustrato bicatenario N7-meG:C (500 nM) durante 5 h a 37 °C en presencia de 50 mM tampón fosfato pH 11 en un volumen final de 20 μ l (Alekseyev *et al.*, 2004). El ADN se precipitó del modo explicado anteriormente. Las muestras se resuspendieron en 25 μ l de agua desionizada y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Síntesis un sustrato de ADN con un sitio abásico en una posición definida

Los sustratos con un sitio abásico generado enzimáticamente se obtuvieron anillando un oligonucleótido, marcado en 5' con fluoresceína, que contiene un residuo de uracilo, con una cadena complementaria con guanina o citosina frente a dicho residuo, según se indique (Tabla 6). La escisión del uracilo del oligonucleótido marcado (200 nM) se llevó a cabo mediante la incubación durante 1 h a 37 °C en presencia de 1,5 U de UDG de *E. coli* (NEB) en un volumen final de 5 µl en presencia del tampón de incisión*.

Los sustratos bicatenarios con un sitio abásico enfrentado a citosina generado enzimáticamente también fueron generados mediante incubación del sustrato bicatenario que contiene N7-meG:C (200 nM) mediante el tratamiento con hAAG (2 U, NEB) durante 8 h a 37 °C en el tampón de incisión, en un volumen final de 5 µl. Los sustratos de ADN que contienen un sitio AP generado por depurinación espontánea fueron generados incubando el dúplex de ADN que contiene un residuo de N7-meG (200 nM) durante 16 h a 37 °C en el tampón de incisión en un volumen final de 5 µl.

**Tampón de incisión*: HEPES-KOH pH 7,8 (45 mM); KCl (70 mM); DTT (1 mM); EDTA (0,4 mM); BSA (3,6 µg) y glicerol (0,2 %).

12.3. Validación de los sustratos

Validación del sustrato con N7-meG en una posición definida

La comprobación del sustrato con N7-meG (20 nM) se llevó a cabo mediante incubación con hAAG (2 U, NEB) y hAPE1 (1 U, NEB) durante 8 h a 37 °C en NEBuffer™ 1, en un volumen final de 50 µl.

Validación del sustrato con me-FAPy-G en una posición definida

La comprobación del oligonucleótido con la lesión me-FAPy-G (20 nM) se llevó a cabo mediante la incubación con EcoFpg (8 U, NEB) durante 8 h a 37 °C en el tampón de reacción ThermoPol®, en un volumen final de 50 µl.

Validación del sustrato con un sitio abásico en una posición definida

La comprobación de los sitios abásicos generados por depurinación espontánea o por escisión del uracilo se llevó a cabo usando hAPE1 (10 U, NEB) en el tampón de reacción para ensayos de incisión a 37 °C, durante el tiempo indicado en cada figura o mediante un tratamiento alcalino con NaOH (15 mM) durante 10 min a 70 °C.

12.4. Ensayos de incisión

Para analizar el nivel de incisión de los diferentes sustratos empleados las reacciones (50 μ l) se llevaron a cabo en el tampón de incisión en ausencia o en presencia de $MgCl_2$ (2 mM), según se indique. La cantidad empleada de sustrato, extractos celulares o proteína recombinantes se especifica en cada caso. Las reacciones se incubaron a 37 °C el tiempo indicado y posteriormente se detuvieron añadiendo 10 μ l de mezcla de proteinasa K* e incubándose a 37 °C durante 30 min. Cuando fue necesario se llevó a cabo la protección de los sitios AP mediante tratamiento con borohidruro sódico ($NaBH_4$; Sigma). Para ello se añadió $NaBH_4$ (230 mM) a las muestras, se incubaron 30 min en hielo y se tamponaron con 5 μ l de TE**. A continuación, para precipitar el ADN, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, Sigma) y tras centrifugar, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al que se le añadió NaCl (0,3 mM), glicógeno (16 μ g/ml) y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. El ADN se precipitó a -20 °C durante 30 min, posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 13.300 rpm y se lavó con 120 μ l de etanol 80 %. Las muestras se resuspendieron en 10 μ l de tampón de carga desnaturante, se calentaron durante 5 min a 50 o 95 °C, según se indique, y se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturante al 12 %, 7 M de urea (Materiales y métodos, apartado 8.2). El ADN marcado con fluoresceína se visualizó excitando el fluoróforo a 473 nm láser azul del sistema de imagen FLA-5100 y se analizó con el software Multigauge 3.0 de Fujifilm.

**Mezcla de Proteinasa K*: EDTA (20 mM); SDS (0,6 %, p/v) y proteinasa K (0,5 mg/ml).

***TE*: Tris-HCl pH 8,0 (10 mM); EDTA pH 8,0 (1 mM).

12.5. Ensayos de inserción de desoxinucleótidos con extractos

Para analizar los intermediarios de reparación generados durante el relleno del hueco obtenido durante la reparación de los diferentes sustratos, se realizaron ensayos de inserción de desoxinucleótidos. Las reacciones (50 μ l) se realizaron en presencia del tampón de incisión complementado con la mezcla de inserción* usando 20 nM de sustrato y 8 μ g de extractos, durante 3 h a 37 °C. Finalmente, las reacciones se detuvieron, las muestras se protegieron, se procesaron y se visualizaron tal y como se describe en el apartado anterior.

**Mezcla de inserción*: NAD (1 mM); dNTPs (20 μ M; dCTP, dGTP, dATP y dTTP, según se indique); ATP (2 mM); fosfocreatina (22 mM); creatina fosfoquinasa (0,25 ng) y $MgCl_2$ (2 mM).

13. Análisis de la interacción entre proteínas mediante ensayos *pull-down*

Los ensayos *pull-down* permiten la detección *in vitro* de interacciones entre dos proteínas. En ellos se inmoviliza una proteína, denominada cebo, a una resina, y se incuba con otra proteína, denominada presa, cuya detección mediante ensayo Western indica la interacción de ambas proteínas.

13.1. *Pull-down* usando MBP-ZDP como proteína cebo y His-FPG como presa

Para el análisis de la interacción de proteínas mediante ensayos de *pull-down* entre MBP-ZDP y His-FPG, se procedió de la siguiente manera: se aplicaron 100 µl de resina de amilosa (NEB) a un tubo eppendorf y se equilibró con solución de Unión 1* (SU1). Posteriormente, se añadieron 30 pmol de MBP-ZDP o MBP y se incubó durante 1 h a 4 °C en rotación. Tras esta primera incubación la columna se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 min. La resina se lavó tres veces con 1 ml de SU1. Tras los lavados, queda en la columna la proteína cebo unida a la matriz de amilosa. A cada columna se añadieron 5 pmol de la proteína presa, His-FPG, y se incubó durante 30 min a 25 °C a 450 rpm. Mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 1 min, todas las proteínas que no quedan retenidas en la columna son eliminadas. La resina se lavó 3 veces con SU2** y se añadieron 20 µl de tampón de carga para proteínas y 20 µl de agua desionizada. Tras ser desnaturalizadas durante 10 min a 95 °C, las muestras se aplicaron a un gel SDS-PAGE al 10 % de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos frente a la cola de histidinas (Santa Cruz).

*Solución de Unión 1 (SU1): Tris pH 7,4 (20 mM); NaCl (200 mM); EDTA (1 mM); β-mercaptoetanol (10 mM).

**Solución de Unión 2 (SU2): Tris pH 7,4 (20 mM); EDTA (1 mM); β-mercaptoetanol (10 mM); Tritón X-100 (1,5 %); NaCl (250 mM).

13.2. *Pull-down* usando His-FPG como cebo y MBP-ZDP como presa

Este ensayo se utilizó para confirmar la interacción entre FPG y ZDP. Para ello se utilizó como proteína cebo His-FPG y se añadió como proteína presa MBP-ZDP o MBP. Se procedió de la siguiente manera: se aplicaron 100 µl de resina Ni²⁺ sefarosa (NEB) a un tubo eppendorf y lavó tres veces con solución de Unión 3* (SU3). Tras los lavados, se añadieron 30 pmoles de His-FPG y se incubaron durante 1 h a 4 °C en rotación. Tras esta primera incubación la columna se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 min y se lavó tres veces con 1 ml de SU3. Tras los lavados, la proteína cebo queda unida a la matriz de Níquel. Posteriormente se añadieron 5 pmol de las proteínas presa, MBP o MBP-ZDP y se incubaron durante 30 min 25 °C a 450 rpm. Mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 1 min.

Finalmente, la resina se lavó 3 veces con SU4** y se añadieron 20 µl de tampón de carga para proteínas y 20 µl de agua desionizada. Tras ser desnaturalizadas durante 10 min a 95 °C, las muestras se aplicaron a un gel SDS-PAGE al 10 % de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos frente a MBP (Santa Cruz).

**Solución de Unión 3 (SU3)*: Tris-HCl pH 8,0 (10 mM); DTT (1 mM); BSA (0,01 mg/ml) e imidazol (60 mM).

***Solución de Unión 4 (SU4)*: Tris-HCl pH 7,4 (20 mM); EDTA (1 mM); β-mercaptoetanol (10 mM); Triton X-100 (1 %); NaCl (100 mM) e imidazol (60 mM).

14. Detección de proteínas mediante Western Blot

Esta técnica se utilizó para la detección de proteínas en los ensayos *pull-down* (Materiales y métodos, apartado 13).

Para esta técnica se utilizaron dos geles SDS-PAGE al 10% en paralelo (Materiales y métodos, apartado 8.3), uno de ellos se tiñó con Solución de Coomassie y el otro se transfirió a una membrana para su posterior detección con anticuerpos.

Transferencia

Para que las proteínas fueran accesibles a la detección por anticuerpos, se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Roche). La electrotransferencia se realizó en tampón de transferencia* a un voltaje constante de 100 V durante 2 h a 4 °C o de 30 V durante 16 h, en el sistema vertical *Mini Trans-Blot cell* de Bio-Rad.

**Tampón de transferencia*: Tris (Trizma base, 48 mM); glicina (39 mM); metanol (20 %, v/v); SDS (0,04 %, p/v) pH 9,2.

Bloqueo

Para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana, ésta se incubó en solución de bloqueo (BS)* durante, al menos, una h a 4°C.

Solución de bloqueo (BS)*: leche en polvo (1 %, p/v de Difco™ Skin Milk, BD) en solución de lavado (TBS).

***Solución de lavado (TBS)*: Tris pH 7,4 (10 mM); NaCl (150 mM).

Detección

La detección de la proteína se llevó a cabo por la adición de anticuerpos específicos. Para la detección de proteínas con cola de histidinas se usó un anticuerpo monoclonal frente a cola de histidinas (*His-Tag Mouse Monoclonal Antibody*, Santa Cruz) a una dilución 1:1.000 en BS. Para la detección de proteínas de fusión a MBP se usó un anticuerpo monoclonal frente a MBP (*Anti-Maltose Binding Protein Mouse Monoclonal*, Santa Cruz) a una dilución 1:1.000

en BS. En ambos casos la incubación con el anticuerpo primario se realizó en agitación durante 1 h a 4 °C.

Tras lavar las membranas cinco veces durante 5 min con solución de lavado con Tween* (TBS-T), se añadió el anticuerpo secundario (*anti-mouse horseradish peroxidase-linked*, Amersham) diluido 1:5.000 en BS. Se incubó 1 h a 4 °C con agitación y se realizaron cinco lavados de 5 min con TBS-T. Para la detección se usó como sustrato de la peroxidasa los dos agentes de detección ECL Prime (Amersham) en proporción 1:1. Tras esperar 2 min a que se produjera la reacción la membrana se reveló usando una cámara CCD (Fujifilm *Intelligent Dark Box* Las 3000).

*Solución de lavado con Tween (TBS-T): Tris pH 7,4 (10 mM); NaCl (150 mM); Tween-20 (0,05 %, v/v).

Bibliografía

- Alekseyev, Y.O., Hamm, M.L., and Essigmann, J.M. (2004). Aflatoxin B1 formamidopyrimidine adducts are preferentially repaired by the nucleotide excision repair pathway in vivo. *Carcinogenesis* 25, 1045-1051.
- Alseth, I., Korvald, H., Osman, F., Seeberg, E., and Bjoras, M. (2004). A general role of the DNA glycosylase Nth1 in the abasic sites cleavage step of base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 32, 5119-5125.
- Altona, C., and Sundaralingam, M. (1972). Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation. *J Am Chem Soc* 94, 8205-8212.
- Aravind, L., and Koonin, E.V. (2000). The alpha/beta fold uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. *Genome Biol* 1, RESEARCH0007.
- Asaeda, A., Ide, H., Asagoshi, K., Matsuyama, S., Tano, K., Murakami, A., Takamori, Y., and Kubo, K. (2000). Substrate specificity of human methylpurine DNA N-glycosylase. *Biochemistry* 39, 1959-1965.
- Asagoshi, K., Terato, H., Ohyama, Y., and Ide, H. (2002). Effects of a guanine-derived formamidopyrimidine lesion on DNA replication: translesion DNA synthesis, nucleotide insertion, and extension kinetics. *J Biol Chem* 277, 14589-14597.
- Babiychuk, E., Kushnir, S., Van Montagu, M., and Inze, D. (1994a). The *Arabidopsis thaliana* apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3299-3303.
- Babiychuk, E., Kushnir, S., Van Montagu, M., and Inze, D. (1994b). The *Arabidopsis thaliana* apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3299-3303.
- Baldwin, M.R., and O'Brien, P.J. (2009). Human AP endonuclease 1 stimulates multiple-turnover base excision by alkyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry* 48, 6022-6033.
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., *et al.* (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255, 609-614.
- Baños-Mateos, S., van Roon, A.M., Lang, U.F., Maslen, S.L., Skehel, J.M., and Lamers, M.H. (2017). High-fidelity DNA replication in *Mycobacterium tuberculosis* relies on a trinuclear zinc center. *Nat Commun* 8, 855.
- Baute, J., and Depicker, A. (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 239-276.
- Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272, 19633-19636.
- Beger, R.D., and Bolton, P.H. (1998). Structures of apurinic and apyrimidinic sites in duplex DNAs. *J Biol Chem* 273, 15565-15573.
- Beland, F.A. (1989). Metabolic activation of aromatic amine carcinogens in vitro and in vivo. *J UOEH* 11 Suppl, 387-397.
- Bennett, S.E., Chen, C.Y., and Mosbaugh, D.W. (2004). *Escherichia coli* nucleoside diphosphate kinase does not act as a uracil-processing DNA repair nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6391-6396.

- Beranek, D.T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231, 11-30.
- Berti, P.J., and McCann, J.A. (2006). Toward a detailed understanding of base excision repair enzymes: transition state and mechanistic analyses of N-glycoside hydrolysis and N-glycoside transfer. *Chem Rev* 106, 506-555.
- Betti, M., Petrucco, S., Bolchi, A., Dieci, G., and Ottonello, S. (2001). A plant 3'-phosphoesterase involved in the repair of DNA strand breaks generated by oxidative damage. *J Biol Chem* 276, 18038-18045.
- Bjoras, M., Klungland, A., Johansen, R.F., and Seeberg, E. (1995). Purification and properties of the alkylation repair DNA glycosylase encoded the MAG gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 34, 4577-4582.
- Boiteux, S., and Laval, J. (1983). Imidazole open ring 7-methylguanine: an inhibitor of DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 110, 552-558.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A., and Laval, J. (1990). Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem* 265, 3916-3922.
- Boorstein, R.J., Hilbert, T.P., Cadet, J., Cunningham, R.P., and Teebor, G.W. (1989). UV-induced pyrimidine hydrates in DNA are repaired by bacterial and mammalian DNA glycosylase activities. *Biochemistry* 28, 6164-6170.
- Bordin, D.L., Lima, M., Lenz, G., Saffi, J., Meira, L.B., Mesange, P., Soares, D.G., Larsen, A.K., Escargueil, A.E., and Henriques, J.A. (2013). DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutat Res* 753, 91-99.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breen, A.P., and Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18, 1033-1077.
- Britt, A. (2002). Repair of damaged bases. *Arabidopsis Book* 1, e0005.
- Caldecott, K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9, 619-631.
- Castaing, B., Fourrey, J.L., Hervouet, N., Thomas, M., Boiteux, S., and Zelwer, C. (1999). AP site structural determinants for Fpg specific recognition. *Nucleic Acids Res* 27, 608-615.
- Coleman, R.S., and Pires, R.M. (1999). Site-specific formation of abasic lesions in DNA. *Nucleosides Nucleotides* 18, 2141-2146.
- Córdoba-Cañero, D., Dubois, E., Ariza, R.R., Doutriaux, M.P., and Roldan-Arjona, T. (2010). *Arabidopsis* uracil DNA glycosylase (UNG) is required for base excision repair of uracil and increases plant sensitivity to 5-fluorouracil. *J Biol Chem* 285, 7475-7483.
- Cordoba-Cañero, D., Morales-Ruiz, T., Roldan-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2009). Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants. *Plant J* 60, 716-728.
- Cordoba-Cañero, D., Roldan-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2011). *Arabidopsis* ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J* 68, 693-702.
- Córdoba-Cañero, D., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2014). *Arabidopsis* ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. *Plant J* 79, 824-834.

- Coste, F., Ober, M., Carell, T., Boiteux, S., Zelwer, C., and Castaing, B. (2004). Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 279, 44074-44083.
- Chen, D.S., Herman, T., and Demple, B. (1991). Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic Acids Res* 19, 5907-5914.
- Chetsanga, C.J., and Lindahl, T. (1979). Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 6, 3673-3684.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., and Fischer, R.L. (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell* 110, 33-42.
- Dany, A.L., and Tissier, A. (2001). A functional OGG1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 265, 293-301.
- de Los Santos, C., El-Khateeb, M., Rege, P., Tian, K., and Johnson, F. (2004). Impact of the C1' configuration of abasic sites on DNA duplex structure. *Biochemistry* 43, 15349-15357.
- Demple, B., and DeMott, M.S. (2002). Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* 21, 8926-8934.
- Demple, B., Herman, T., and Chen, D.S. (1991). Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11450-11454.
- DePamphilis, M.L. (2006). DNA replication and human disease (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Dianov, G.L., and Hubscher, U. (2013). Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic Acids Res* 41, 3483-3490.
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., and Kaina, B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol* 73, 269-278.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., and Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32, 1102-1115.
- Dizdaroglu, M., Kirkali, G., and Jaruga, P. (2008). Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med* 45, 1610-1621.
- Doetsch, P.W., and Cunningham, R.P. (1990). The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mutat Res* 236, 173-201.
- Doherty, A.J., Serpell, L.C., and Ponting, C.P. (1996). The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res* 24, 2488-2497.
- Drohat, A.C., and Maiti, A. (2014). Mechanisms for enzymatic cleavage of the N-glycosidic bond in DNA. *Org Biomol Chem* 12, 8367-8378.
- Duclos, S., Aller, P., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Wallace, S.S., and Doublié, S. (2012). Structural and biochemical studies of a plant formamidopyrimidine-DNA glycosylase reveal why eukaryotic Fpg glycosylases do not excise 8-oxoguanine. *DNA Repair (Amst)* 11, 714-725.
- Dunlap, B., and Cerutti, P. (1975). Apyrimidinic sites in gamma-irradiated DNA. *FEBS Lett* 51, 188-190.

- Dyrkheeva, N.S., Lebedeva, N.A., and Lavrik, O.I. (2016). AP Endonuclease 1 as a Key Enzyme in Repair of Apurinic/Apyrimidinic Sites. *Biochemistry (Mosc)* **81**, 951-967.
- Eide, L., Bjoras, M., Pirovano, M., Alseth, I., Berdal, K.G., and Seeberg, E. (1996). Base excision of oxidative purine and pyrimidine DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* by a DNA glycosylase with sequence similarity to endonuclease III from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10735-10740.
- Erickson, L.C., Laurent, G., Sharkey, N.A., and Kohn, K.W. (1980). DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature* **288**, 727-729.
- Eritja, R., Horowitz, D.M., Walker, P.A., Ziehler-Martin, J.P., Boosalis, M.S., Goodman, M.F., Itakura, K., and Kaplan, B.E. (1986). Synthesis and properties of oligonucleotides containing 2'-deoxynebularine and 2'-deoxyxanthosine. *Nucleic Acids Res* **14**, 8135-8153.
- Ezaz-Nikpay, K., and Verdine, G.L. (1994). The effects of N7-methylguanine on duplex DNA structure. *Chem Biol* **1**, 235-240.
- Fortini, P., and Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* **6**, 398-409.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J., and Dogliotti, E. (1999). The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* **274**, 15230-15236.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H., and Dogliotti, E. (1998). Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* **37**, 3575-3580.
- Freudenthal, B.D., Beard, W.A., Cuneo, M.J., Dyrkheeva, N.S., and Wilson, S.H. (2015). Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 924-931.
- Friedberg, E.C. (2006). *DNA repair and mutagenesis*, 2nd ed edn (Washington, D.C.: ASM Press).
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. (1995). *DNA repair and mutagenesis* (Washington, D.C.: ASM Press).
- Fromme, J.C., and Verdine, G.L. (2002). Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM. *Nat Struct Biol* **9**, 544-552.
- Fromme, J.C., and Verdine, G.L. (2003). Structure of a trapped endonuclease III-DNA covalent intermediate. *EMBO J* **22**, 3461-3471.
- Fu, D., Calvo, J.A., and Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* **12**, 104-120.
- Garcia-Diaz, M., Dominguez, O., Lopez-Fernandez, L.A., de Lera, L.T., Saniger, M.L., Ruiz, J.F., Parraga, M., Garcia-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., *et al.* (2000). DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol* **301**, 851-867.
- Garcia-Ortiz, M.V., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2001). An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **47**, 795-804.
- Garcin, E.D., Hosfield, D.J., Desai, S.A., Haas, B.J., Bjoras, M., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A. (2008). DNA apurinic-apyrimidinic site binding and excision by endonuclease IV. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 515-522.
- Gates, K.S., Nooner, T., and Dutta, S. (2004). Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chem Res Toxicol* **17**, 839-856.

- Georgiadis, M.M., Luo, M., Gaur, R.K., Delaplane, S., Li, X., and Kelley, M.R. (2008). Evolution of the redox function in mammalian apurinic/aprimidinic endonuclease. *Mutat Res* 643, 54-63.
- Gilboa, R., Zharkov, D.O., Golan, G., Fernandes, A.S., Gerchman, S.E., Matz, E., Kycia, J.H., Grollman, A.P., and Shoham, G. (2002). Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA. *J Biol Chem* 277, 19811-19816.
- Goljer, I., Kumar, S., and Bolton, P.H. (1995). Refined solution structure of a DNA heteroduplex containing an aldehydic abasic site. *J Biol Chem* 270, 22980-22987.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L., and Zhu, J.K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111, 803-814.
- Gorman, M.A., Morera, S., Rothwell, D.G., de La Fortelle, E., Mol, C.D., Tainer, J.A., Hickson, I.D., and Freemont, P.S. (1997). The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *EMBO J* 16, 6548-6558.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanna, M., Chow, B.L., Morey, N.J., Jinks-Robertson, S., Doetsch, P.W., and Xiao, W. (2004). Involvement of two endonuclease III homologs in the base excision repair pathway for the processing of DNA alkylation damage in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Repair (Amst)* 3, 51-59.
- Hartwig, A. (2001). Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res* 475, 113-121.
- Hays, J.B. (2002). Arabidopsis thaliana, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair (Amst)* 1, 579-600.
- Hazra, T.K., Izumi, T., Boldogh, I., Imhoff, B., Kow, Y.W., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., and Mitra, S. (2002). Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3523-3528.
- Hendershot, J.M., and O'Brien, P.J. (2014). Critical role of DNA intercalation in enzyme-catalyzed nucleotide flipping. *Nucleic Acids Res* 42, 12681-12690.
- Hendershot, J.M., Wolfe, A.E., and O'Brien, P.J. (2011). Substitution of active site tyrosines with tryptophan alters the free energy for nucleotide flipping by human alkyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry* 50, 1864-1874.
- Hitomi, K., Iwai, S., and Tainer, J.A. (2007). The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst)* 6, 410-428.
- Hoehn, S.T., Turner, C.J., and Stubbe, J. (2001). Solution structure of an oligonucleotide containing an abasic site: evidence for an unusual deoxyribose conformation. *Nucleic Acids Res* 29, 3413-3423.
- Hosfield, D.J., Guan, Y., Haas, B.J., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A. (1999). Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis. *Cell* 98, 397-408.
- Huffman, J.L., Sundheim, O., and Tainer, J.A. (2005). DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat Res* 577, 55-76.
- Jiang, D., Hatahet, Z., Melamede, R.J., Kow, Y.W., and Wallace, S.S. (1997). Characterization of Escherichia coli endonuclease VIII. *J Biol Chem* 272, 32230-32239.

- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X.M., Scherer, S.W., and Lasko, D.D. (1999). Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem* 274, 24176-24186.
- Kashkina, E., Qi, T., Weinfeld, M., and Young, D. (2012). Polynucleotide kinase/phosphatase, Pnk1, is involved in base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair (Amst)* 11, 676-683.
- Kathe, S.D., Barrantes-Reynolds, R., Jaruga, P., Newton, M.R., Burrows, C.J., Bandaru, V., Dizdaroglu, M., Bond, J.P., and Wallace, S.S. (2009). Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases. *DNA Repair (Amst)* 8, 643-653.
- Klungland, A., and Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 16, 3341-3348.
- Koch, C.A., Agyei, R., Galicia, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Starostine, A., Weinfeld, M., and Durocher, D. (2004). Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J* 23, 3874-3885.
- Kozekov, I.D., Nechev, L.V., Moseley, M.S., Harris, C.M., Rizzo, C.J., Stone, M.P., and Harris, T.M. (2003). DNA interchain cross-links formed by acrolein and crotonaldehyde. *J Am Chem Soc* 125, 50-61.
- Krokan, H.E., Standal, R., and Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325 (Pt 1), 1-16.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E., and Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 15, 6662-6670.
- Kulikowska, E., Kierdaszuk, B., and Shugar, D. (2004). Xanthine, xanthosine and its nucleotides: solution structures of neutral and ionic forms, and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways. *Acta Biochim Pol* 51, 493-531.
- Labahn, J., Scharer, O.D., Long, A., Ezaz-Nikpay, K., Verdine, G.L., and Ellenberger, T.E. (1996). Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA. *Cell* 86, 321-329.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lau, A.Y., Scharer, O.D., Samson, L., Verdine, G.L., and Ellenberger, T. (1998). Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision. *Cell* 95, 249-258.
- Lau, A.Y., Wyatt, M.D., Glassner, B.J., Samson, L.D., and Ellenberger, T. (2000). Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13573-13578.
- Lawley, P.D., and Brookes, P. (1963). Further Studies on the Alkylation of Nucleic Acids and Their Constituent Nucleotides. *Biochem J* 89, 127-138.
- Lee, A.J., and Wallace, S.S. (2017). Hide and seek: How do DNA glycosylases locate oxidatively damaged DNA bases amidst a sea of undamaged bases? *Free Radic Biol Med* 107, 170-178.
- Lee, J., Jang, H., Shin, H., Choi, W.L., Mok, Y.G., and Huh, J.H. (2014). AP endonucleases process 5-methylcytosine excision intermediates during active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 42, 11408-11418.

- Levin, D.S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M., and Tomkinson, A.E. (1997). An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12863-12868.
- Levin, J.D., and Demple, B. (1990). Analysis of class II (hydrolytic) and class I (beta-lyase) apurinic/apyrimidinic endonucleases with a synthetic DNA substrate. *Nucleic Acids Res* *18*, 5069-5075.
- Lhomme, J., Constant, J.F., and Demeunynck, M. (1999). Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers* *52*, 65-83.
- Li, Y., Cordoba-Cañero, D., Qian, W., Zhu, X., Tang, K., Zhang, H., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., and Zhu, J.K. (2015). An AP endonuclease functions in active DNA demethylation and gene imprinting in Arabidopsis [corrected]. *PLoS Genet* *11*, e1004905.
- Lindahl, T. (1974). An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 3649-3653.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* *362*, 709-715.
- Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *65*, 127-133.
- Lindahl, T., and Karlstrom, O. (1973). Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* *12*, 5151-5154.
- Lindahl, T., Karran, P., and Wood, R.D. (1997). DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* *7*, 158-169.
- Lindahl, T., and Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* *11*, 3610-3618.
- Liu, B., Xue, Q., Tang, Y., Cao, J., Guengerich, F.P., and Zhang, H. (2016). Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage. *Mutat Res Rev Mutat Res* *768*, 53-67.
- Liu, L.F., Desai, S.D., Li, T.K., Mao, Y., Sun, M., and Sim, S.P. (2000). Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* *922*, 1-10.
- Ljungquist, S. (1977). A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA. *J Biol Chem* *252*, 2808-2814.
- Ljungquist, S., Lindahl, T., and Howard-Flanders, P. (1976). Methyl methane sulfonate-sensitive mutant of *Escherichia coli* deficient in an endonuclease specific for apurinic sites in deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* *126*, 646-653.
- Loeb, L.A., Preston, B.D., Snow, E.T., and Schaaper, R.M. (1986). Apurinic sites as common intermediates in mutagenesis. *Basic Life Sci* *38*, 341-347.
- Lu, D., Silhan, J., MacDonald, J.T., Carpenter, E.P., Jensen, K., Tang, C.M., Baldwin, G.S., and Freemont, P.S. (2012). Structural basis for the recognition and cleavage of abasic DNA in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 16852-16857.
- Manoharan, M., Ransom, S.C., Mazumder, A., Gerlt, J.A., Wilde, J.A., Withka, J.A., and Bolton, P.H. (1988). The characterization of abasic sites in DNA heteroduplexes by site specific labeling with carbon-13. *J Am Chem Soc* *110*, 1620-1622.

- Martinez-Macias, M.I., Cordoba-Canero, D., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2013). The DNA repair protein XRCC1 functions in the plant DNA demethylation pathway by stimulating cytosine methylation (5-meC) excision, gap tailoring, and DNA ligation. *J Biol Chem* 288, 5496-5505.
- Martinez-Macias, M.I., Qian, W., Miki, D., Pontes, O., Liu, Y., Tang, K., Liu, R., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., *et al.* (2012). A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 45, 357-370.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., and Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282, 662, 679-682.
- Mitchell, D.L., and Nairn, R.S. (1989). The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49, 805-819.
- Mol, C.D., Hosfield, D.J., and Tainer, J.A. (2000a). Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res* 460, 211-229.
- Mol, C.D., Izumi, T., Mitra, S., and Tainer, J.A. (2000b). DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected]. *Nature* 403, 451-456.
- Monks, T.J., Hanzlik, R.P., Cohen, G.M., Ross, D., and Graham, D.G. (1992). Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 112, 2-16.
- Morales-Ruiz, T., Birincioglu, M., Jaruga, P., Rodriguez, H., Roldan-Arjona, T., and Dizdaroglu, M. (2003). *Arabidopsis thaliana* Ogg1 protein excises 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA containing multiple lesions. *Biochemistry* 42, 3089-3095.
- Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2006). DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6853-6858.
- Morgan, A.R. (1993). Base mismatches and mutagenesis: how important is tautomerism? *Trends Biochem Sci* 18, 160-163.
- Murphy, T.M., Belmonte, M., Shu, S., Britt, A.B., and Hatteroth, J. (2009). Requirement for abasic endonuclease gene homologues in *Arabidopsis* seed development. *PLoS One* 4, e4297.
- Murphy, T.M., and Gao, M.J. (2001). Multiple forms of formamidopyrimidine-DNA glycosylase produced by alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *J Photochem Photobiol B* 61, 87-93.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321-4325.
- Nash, R.A., Caldecott, K.W., Barnes, D.E., and Lindahl, T. (1997). XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 36, 5207-5211.
- Nilsen, L., Forstrom, R.J., Bjoras, M., and Alseth, I. (2012). AP endonuclease independent repair of abasic sites in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 40, 2000-2009.
- O'Brien, P.J., and Ellenberger, T. (2003). Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines. *Biochemistry* 42, 12418-12429.
- O'Brien, P.J., and Ellenberger, T. (2004). Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 279, 9750-9757.

- Ohtsubo, T., Matsuda, O., Iba, K., Terashima, I., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. (1998). Molecular cloning of AtMMH, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli* mutM gene, and analysis of functional domains of its product. *Mol Gen Genet* 259, 577-590.
- Ortega-Galisteo, A.P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2008). *Arabidopsis* DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol* 67, 671-681.
- Parikh, S.S., Walcher, G., Jones, G.D., Slupphaug, G., Krokan, H.E., Blackburn, G.M., and Tainer, J.A. (2000). Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5083-5088.
- Pascucci, B., Maga, G., Hubscher, U., Bjoras, M., Seeberg, E., Hickson, I.D., Villani, G., Giordano, C., Cellai, L., and Dogliotti, E. (2002). Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins. *Nucleic Acids Res* 30, 2124-2130.
- Pegg, A.E. (1984). Methylation of the O6 position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents. *Cancer Invest* 2, 223-231.
- Petrucchio, S., Volpi, G., Bolchi, A., Rivetti, C., and Ottonello, S. (2002). A nick-sensing DNA 3'-repair enzyme from *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277, 23675-23683.
- Podlutzky, A.J., Dianova, II, Podust, V.N., Bohr, V.A., and Dianov, G.L. (2001). Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *EMBO J* 20, 1477-1482.
- Poklar, N., Pilch, D.S., Lippard, S.J., Redding, E.A., Dunham, S.U., and Breslauer, K.J. (1996). Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7606-7611.
- Poole, A., Penny, D., and Sjöberg, B.M. (2001). Confounded cytosine! Tinkering and the evolution of DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 147-151.
- Pourquier, P., Ueng, L.M., Kohlhagen, G., Mazumder, A., Gupta, M., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1997). Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *J Biol Chem* 272, 7792-7796.
- Ramiro-Merina, A., Ariza, R.R., and Roldan-Arjona, T. (2013). Molecular characterization of a putative plant homolog of MBD4 DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* 12, 890-898.
- Rasouli-Nia, A., Karimi-Busheri, F., and Weinfeld, M. (2004). Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6905-6910.
- Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.
- Roldan-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* 681, 169-179.
- Roldán-Arjona, T., García-Ortiz, M.V., Ruiz-Rubio, M., and Ariza, R.R. (2000). cDNA cloning, expression and functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *Escherichia coli* DNA repair enzyme endonuclease III. *Plant Mol Biol* 44, 43-52.
- Roy, R., Biswas, T., Lee, J.C., and Mitra, S. (2000). Mutation of a unique aspartate residue abolishes the catalytic activity but not substrate binding of the mouse N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG). *J Biol Chem* 275, 4278-4282.

- Samson, L., Derfler, B., Boosalis, M., and Call, K. (1991). Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9127-9131.
- Santerre, A., and Britt, A.B. (1994). Cloning of a 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2240-2244.
- Sedgwick, B. (2004). Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 148-157.
- Sedgwick, B., and Vaughan, P. (1991). Widespread adaptive response against environmental methylating agents in microorganisms. *Mutat Res* 250, 211-221.
- Seki, S., Ikeda, S., Watanabe, S., Hatsushika, M., Tsutsui, K., Akiyama, K., and Zhang, B. (1991). A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/apyrimidinic endonuclease activities: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1079, 57-64.
- Selkirk, J.K. (1980). Chemical carcinogenesis: a brief overview of the mechanism of action of polycyclic hydrocarbons, aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins. *Carcinog Compr Surv* 5, 1-31.
- Shrivastav, N., Li, D., and Essigmann, J.M. (2010). Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* 31, 59-70.
- Sidorenko, V.S., Mechetin, G.V., Nevinsky, G.A., and Zharkov, D.O. (2008). Ionic strength and magnesium affect the specificity of *Escherichia coli* and human 8-oxoguanine-DNA glycosylases. *FEBS J* 275, 3747-3760.
- Singhal, R.K., Prasad, R., and Wilson, S.H. (1995). DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. *J Biol Chem* 270, 949-957.
- Smela, M.E., Currier, S.S., Bailey, E.A., and Essigmann, J.M. (2001). The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22, 535-545.
- Stivers, J.T., and Jiang, Y.L. (2003). A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases. *Chem Rev* 103, 2729-2759.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.
- Subirana, J.A., and Soler-Lopez, M. (2003). Cations as hydrogen bond donors: a view of electrostatic interactions in DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, 27-45.
- Takeshita, M., Chang, C.N., Johnson, F., Will, S., and Grollman, A.P. (1987). Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. Model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases. *J Biol Chem* 262, 10171-10179.
- Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., Antoshechkin, I., Miller, J., Grollman, A.P., and Johnson, F. (1994). Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J Biol Chem* 269, 15318-15324.
- Teoule, R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51, 573-589.
- Thayer, M.M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A. (1995). Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J* 14, 4108-4120.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.

- Thomas, L., Yang, C.H., and Goldthwait, D.A. (1982). Two DNA glycosylases in *Escherichia coli* which release primarily 3-methyladenine. *Biochemistry* **21**, 1162-1169.
- Uchiyama, Y., Takeuchi, R., Kodera, H., and Sakaguchi, K. (2009). Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes. *Biochimie* **91**, 165-170.
- Valentine, J.S., Wertz, D.L., Lyons, T.J., Liou, L.L., Goto, J.J., and Gralla, E.B. (1998). The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr Opin Chem Biol* **2**, 253-262.
- Vasquez-Del Carpio, R., Silverstein, T.D., Lone, S., Johnson, R.E., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A.K. (2011). Role of human DNA polymerase kappa in extension opposite from a cis-syn thymine dimer. *J Mol Biol* **408**, 252-261.
- Vasseur, J.J., Peoc'h, D., Rayner, B., and Imbach, J.L. (1991). Derivatization of Oligonucleotides Through Abasic Site Formation. *Nucleosides Nucleotides* **10**, 107-117.
- Vidal, A.E., Hickson, I.D., Boiteux, S., and Radicella, J.P. (2001). Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res* **29**, 1285-1292.
- Waters, T.R., Gallinari, P., Jiricny, J., and Swann, P.F. (1999). Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1. *J Biol Chem* **274**, 67-74.
- Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S.H., *et al.* (2004). AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* **15**, 209-220.
- Wilde, J.A., Bolton, P.H., Mazumder, A., Manoharan, M., and Gerlt, J.A. (1989). Characterization of the equilibrating forms of the aldehydic abasic site in duplex DNA by oxygen-17 NMR. *J Am Chem Soc* **111**, 1894-1896.
- Wilson, D.M., and Barsky, D. (2001). The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* **485**, 283-307.
- Williams, A.A., Darwanto, A., Theruvathu, J.A., Burdzy, A., Neidigh, J.W., and Sowers, L.C. (2009). Impact of sugar pucker on base pair and mispair stability. *Biochemistry* **48**, 11994-12004.
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.C., and Curran, T. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J* **11**, 3323-3335.
- Xanthoudakis, S., Miao, G.G., and Curran, T. (1994). The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 23-27.
- You, H.J., Swanson, R.L., and Doetsch, P.W. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* possesses two functional homologues of *Escherichia coli* endonuclease III. *Biochemistry* **37**, 6033-6040.
- Zharkov, D.O., Shoham, G., and Grollman, A.P. (2003). Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases. *DNA Repair (Amst)* **2**, 839-862.

Publicación

Nonenzymatic release of N7-methylguanine channels repair of abasic sites into an AP endonuclease-independent pathway in *Arabidopsis*

Casimiro Barbado^{a,b,c}, Dolores Córdoba-Cañero^{a,b,c}, Rafael R. Ariza^{a,b,c,1}, and Teresa Roldán-Arjona^{a,b,c,1}

^aMaimónides Biomedical Research Institute of Córdoba, 14004 Córdoba, Spain; ^bDepartment of Genetics, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; and ^cReina Sofia University Hospital, 14004 Córdoba, Spain

Edited by Philip C. Hanawalt, Stanford University, Stanford, CA, and approved December 19, 2017 (received for review November 8, 2017)

Abasic (apurinic/apyrimidinic, AP) sites in DNA arise from spontaneous base loss or by enzymatic removal during base excision repair. It is commonly accepted that both classes of AP site have analogous biochemical properties and are equivalent substrates for AP endonucleases and AP lyases, although the relative roles of these two types of enzymes are not well understood. We provide here genetic and biochemical evidence that, in *Arabidopsis*, AP sites generated by spontaneous loss of N7-methylguanine (N7-meG) are exclusively repaired through an AP endonuclease-independent pathway initiated by FPG, a bifunctional DNA glycosylase with AP lyase activity. Abasic site incision catalyzed by FPG generates a single-nucleotide gap with a 3'-phosphate terminus that is processed by the DNA 3'-phosphatase ZDP before repair is completed. We further show that the major AP endonuclease in *Arabidopsis* (ARP) incises AP sites generated by enzymatic N7-meG excision but, unexpectedly, not those resulting from spontaneous N7-meG loss. These findings, which reveal previously undetected differences between products of enzymatic and nonenzymatic base release, may shed light on the evolution and biological roles of AP endonucleases and AP lyases.

base excision repair | AP endonucleases | AP lyases | abasic sites | N7-methylguanine

Abasic (apurinic/apyrimidinic, AP) sites are ubiquitous DNA lesions generated by spontaneous hydrolysis of the N-glycosylic bond connecting the base with the deoxyribose moiety of the nucleotide (1). It has been estimated that 2,000–10,000 AP sites arise spontaneously per mammalian cell per generation (2). Abasic sites are also generated as intermediates during the base excision repair (BER) pathway, following excision of damaged bases by monofunctional DNA glycosylases (3, 4). In addition, they may be induced directly by oxygen radical species (5) and indirectly by spontaneous release of alkylated bases such as N7-methylguanine (N7-meG) (5–7). Under physiological conditions, AP sites exist in an equilibrium mixture of α - and β -hemiacetals of the closed furanose form, with $\sim 1\%$ present in the opened aldehyde form (8). The latter is prone to spontaneous hydrolysis by β - and δ -elimination, generating single-strand breaks (SSB) (9). AP sites can block DNA replication and transcription and slowly decay to form SSB, therefore causing cytotoxic effects. They are also mutagenic due to erroneous bypass by translesion DNA synthesis (10).

Abasic sites are mainly repaired through BER initiated either by AP endonucleases or by AP lyase activities associated with bifunctional DNA glycosylases (4, 11, 12). AP endonucleases hydrolyze DNA at the 5'-side of the AP site, leaving 3'-hydroxyl (3'-OH) and 5'-deoxyribose phosphate (5'-dRP) termini (13). AP lyases cleave 3' to the AP site by β -elimination, generating 3'-phosphor- α , β -unsaturated aldehyde (3'-PUA), and 5'-phosphate (5'-P) termini. A subset of AP lyases catalyze β , δ -elimination and generate 3'-phosphate (3'-P) termini (13). Therefore, AP endonucleases and AP lyases generate single-nucleotide gaps with 5'- and 3'-blocked ends, respectively. The processing of such

noncanonical termini influences subsequent steps of the repair process, which may continue through insertion of either one (short-patch, SP-BER) or several (long-patch, LP-BER) nucleotides (14, 15).

In SP-BER, the 5'-dRP group generated by AP endonucleases is converted to 5'-P by a deoxyribosephosphatase activity that in mammalian cells is associated to DNA polymerase β (16). However, such step is rate-limiting (17) and the 5'-dRP may be also removed as part of an oligonucleotide excised by FEN1 nuclease after strand displacement during LP-BER (14). Since AP lyases produce canonical 5'-P termini, it has been proposed that they usually initiate SP-BER (18). In this case, processing of 3'-PUA generated by β -elimination is carried out by a 3'-phosphodiesterase activity associated to AP endonucleases (19, 20) and 3'-P produced by β , δ -elimination is removed by a DNA 3'-phosphatase, such a mammalian PNK (21) or plant ZDP (22, 23). Therefore, AP site incision by either AP endonucleases or AP lyases determines downstream BER steps requiring different subsets of proteins. However, the factors influencing the choice between both types of enzymes are unknown.

BER has been extensively studied in bacterial, yeast, and mammalian systems, but knowledge about this crucial repair pathway has been gained in plants only recently. Results obtained so far, mostly in *Arabidopsis*, indicate that plants share many BER components with other organisms but possess some distinctive features and combinations. In *Arabidopsis*, repair of uracil is initiated by the

Significance

Abasic (apurinic/apyrimidinic, AP) sites in DNA result from spontaneous and repair-mediated base release. They may be processed by AP endonucleases or AP lyases, but the relative roles of both types of enzymes are poorly understood. Our study reveals that the model plant *Arabidopsis* uses an AP lyase-dependent pathway to repair AP sites generated by spontaneous loss of N7-methylguanine (N7-meG), a major lesion arising from DNA methylation damage. We further show that the main *Arabidopsis* AP endonuclease is active on AP sites generated by enzymatic excision of N7-meG, but not on those arising from N7-meG loss. Our findings identify an important role for AP lyase activity in plants and challenge the assumption that spontaneous and repair-generated AP sites have identical biochemical properties.

Author contributions: D.C.-C., R.R.A., and T.R.-A. designed research; C.B. performed research; C.B., D.C.-C., R.R.A., and T.R.-A. analyzed data; and C.B., D.C.-C., R.R.A., and T.R.-A. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

This open access article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

¹To whom correspondence may be addressed. Email: ge1roarr@uco.es or ge2roarm@uco.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1719497115/-DCSupplemental.

monofunctional uracil DNA glycosylase UNG (24), and the ensuing AP sites may be processed by both AP lyase and AP endonuclease activities detectable in cell extracts (15, 25). Interestingly, and despite the lack of plant homologs of Pol β and LigIII, repair proceeds not only by LP-BER but also through SP-BER, and in both cases the final ligation step is catalyzed by LIG1 (15, 25). *Arabidopsis* also possesses an MBD4-like protein active on U:G and T:G mismatches but, unlike its mammalian homolog, it lacks a methyl-CpG-binding domain (26). Removal of oxidized pyrimidines is carried out by an NTH1 homolog (27), whereas repair of oxidized guanine (8-oxoG) involves both FPG and OGG1 homologs (22, 28–30), a distinctive combination of bacterial-like and eukaryotic-like 8-oxoG DNA glycosylases characteristic of plants and some fungi (31). Repair intermediates generated by the bifunctional DNA glycosylases FPG and OGG1 are processed by the DNA 3'-phosphatase ZDP and ARP, the major AP endonuclease detectable in *Arabidopsis* cell extracts (22). In addition to removing damaged bases, plants use BER for epigenetic reprogramming initiated by 5-mC DNA glycosylases/lyases of the ROS1/DME family (32, 33). These enzymes generate single-nucleotide gaps with either 3'-PUA or 3'-P ends (32, 33) that are processed by the 3'-phosphodiesterase activity of AP endonuclease APE1L (20) and the DNA 3'-phosphatase ZDP (23), respectively. Although *Arabidopsis* possesses several DNA glycosylases/lyases (27–29, 32, 33) and three different AP endonucleases (34), their relative roles in the repair of AP sites have not been established so far.

It is generally accepted that AP site repair in vivo is predominantly initiated by AP endonucleases, but there is evidence that AP lyases play a prominent role in yeast. Thus, AP sites in *Schizosaccharomyces pombe* are primarily incised by the DNA glycosylase/AP lyase Nth1, which generates 3'-PUA ends that are further processed by the phosphodiesterase activity of Apn2, the major AP endonuclease in fission yeast (35, 36). Rather than AP incision, the main function of Apn2 appears to be the removal of 3'-blocked ends generated by the AP lyase activity of Nth1. A similar mechanism operates in *Saccharomyces cerevisiae* (37).

The biological relevance of AP lyases in the processing of abasic sites is poorly understood, and it has been suggested that it may be a yeast-specific feature (38). In this paper we report biochemical and genetic evidence that the AP lyase activity of *Arabidopsis* DNA glycosylase FPG plays a major role in the repair of AP sites generated by spontaneous depurination of N7-meG. FPG incision generates a 3'-P terminus that is converted to 3'-OH by the DNA 3'-phosphatase ZDP, enabling DNA polymerase and ligase activities to complete repair in an AP endonuclease-independent pathway. Importantly, we found that ARP, the major AP endonuclease in *Arabidopsis*, is active on AP sites generated by enzymatic excision of N7-meG but not on products of spontaneous N7-meG depurination. Our results indicate that hitherto unknown differences between the products of enzymatic and nonenzymatic base release dictate AP site DNA repair choice in *Arabidopsis*.

Results

Preparation and Characterization of Substrates to Monitor Repair of DNA Methylation Damage in *Arabidopsis* Cell-Free Extracts. ZDP is the major, if not the only, DNA 3'-phosphatase activity detected in *Arabidopsis* cells (23). We have previously reported that ZDP is required to process 3'-P termini generated by FPG during 8-oxoG repair (22) or by ROS1 during active DNA demethylation (23). Intriguingly, *zdp*^{-/-} mutants are hypersensitive to methyl methanesulfonate (MMS) (23), suggesting that ZDP also plays an important role in the repair of alkylation DNA damage.

The most abundant lesion caused by MMS is N7-meG, which accounts for 80–85% of total DNA methylation (39). This lesion is neither cytotoxic nor mutagenic but under physiological conditions undergoes spontaneous depurination, exhibiting half-lives ranging from 69 to 192 h at neutral pH and 37 °C (7). In addition, N7-meG may suffer opening of its imidazole ring to yield 5-N-methyl-2,6-

diamino-4-hydroxyformamidopyrimidine (me-FAPy-G), in a reaction favored by basic conditions (7).

To monitor repair of MMS-induced DNA damage in *Arabidopsis* cell extracts we prepared a DNA duplex containing a single N7-meG residue using an enzymatic method (40) (Fig. S1A). We also generated an analogous substrate with me-FAPy-G by incubating the N7-meG-containing DNA at 37 °C for 5 h at pH 11. N7-meG is known to be excised by the monofunctional human alkyladenine DNA glycosylase (hAAG) (41), whereas *Escherichia coli* Fpg excises me-FAPy-G very efficiently (42). As shown in Fig. S1B, the oligonucleotide containing N7-meG was completely cleaved upon incubation with hAAG and human AP endonuclease 1 (hAPE1), while no product was observed for the me-FAPy-G substrate. Conversely, the oligonucleotide containing me-FAPy-G was fully cleaved by *E. coli* Fpg but was resistant to treatment with hAAG and hAPE1. As expected, reaction products generated by hAPE1 and *E. coli* Fpg contained 3'-OH and 3'-P termini, respectively (Fig. S1B).

The DNA Phosphatase ZDP Functions Downstream of FPG During Repair of DNA Containing N7-meG. We next incubated cell extracts from WT and *zdp*^{-/-} or *fpg*^{-/-} mutant plants with DNA substrates containing either N7-meG or me-FAPy-G (Fig. 1A–C). No incision products were detected in reactions with the DNA substrate containing me-FAPy-G (Fig. 1A). However, when incubated with the duplex containing N7-meG in the absence of Mg²⁺, WT extracts generated a product with a 3'-P terminus that was converted into a 3'-OH end upon Mg²⁺ addition (Fig. 1B, lanes 2 and 6). Such conversion was undetectable in *zdp*^{-/-} mutant extracts (Fig. 1B, lanes 3 and 7), but was restored when purified recombinant ZDP protein was added to the repair reaction (Fig. 1C, lanes 3 and 4). These results indicate that ZDP phosphatase activity is required to process a 3'-P intermediate generated during the repair of DNA containing N7-meG.

We have previously shown that ZDP processes 3'-P termini generated by FPG during 8-oxoG repair (22). Therefore, we hypothesized that this DNA glycosylase/lyase might be also responsible for the generation of such intermediates during N7-meG repair. We found that cell extracts from mutant *fpg*^{-/-} plants do not generate detectable repair incision products, either in the absence or the presence of Mg²⁺ (Fig. 1B, lanes 4 and 8). These results indicate that FPG functions in the repair of DNA containing N7-meG, performing a β , δ -elimination and generating a single-nucleotide gap with a 3'-P terminus that is converted to 3'-OH by the DNA 3'-phosphatase activity of ZDP.

Since ZDP is required to process FPG products, we tested for a direct interaction between both proteins using pull-down assays (Fig. 1D). We found His-FPG bound to MBP-ZDP, but not to MBP alone, immobilized in an amylose column (Fig. 1D, Upper). Conversely, MBP-ZDP, but not MBP alone, bound to His-FPG immobilized in a nickel-agarose column (Fig. 1D, Lower). These results suggest that FPG and ZDP directly interact in vitro.

The results described above suggest that FPG functions upstream ZDP during repair of DNA containing N7-meG. We therefore hypothesized that the hypersensitivity of *zdp*^{-/-} mutants to MMS could be due to the accumulation of unprocessed SSB intermediates containing 3'-P ends generated by FPG. To test this idea, we generated a double *fpg*^{-/-} *zdp*^{-/-} mutant and assessed its resistance to MMS in comparison with WT and single *fpg*^{-/-} or *zdp*^{-/-} mutants (Fig. 1E). The results show that inactivation of FPG activity in *zdp*^{-/-} mutant plants restores MMS resistance to nearly WT levels. Altogether, these results indicate that FPG functions upstream ZDP during repair of DNA containing N7-meG. We also found that, while single *fpg*^{-/-} mutants are not sensitive to MMS, the combined deficiency of FPG and ARP, the major *Arabidopsis* AP endonuclease (25), causes an MMS sensitivity similar to that of *zdp*^{-/-} mutants. These results suggest that ARP also plays a role in the repair of MMS-induced DNA damage.

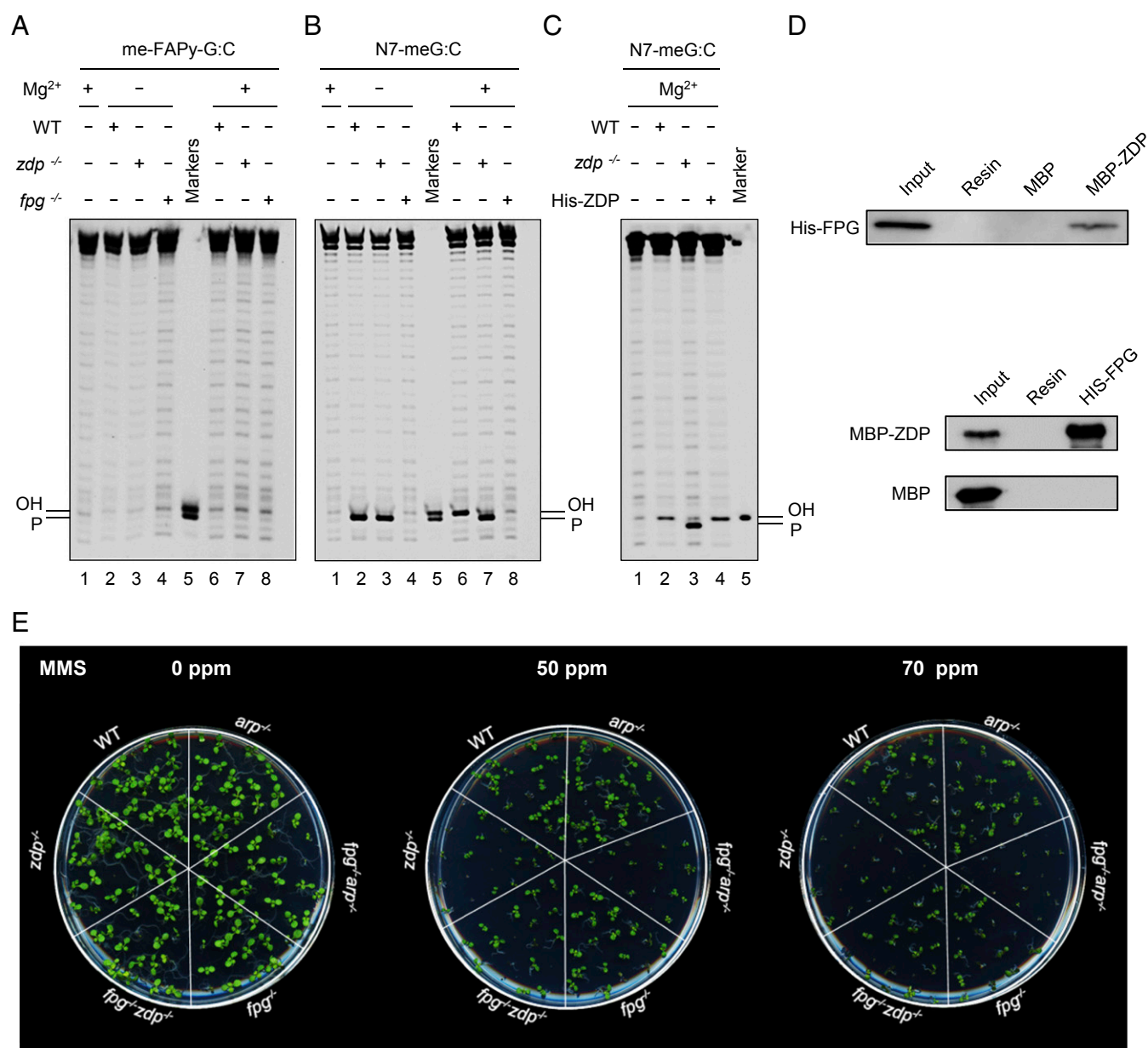


Fig. 1. ZDP 3'-phosphatase functions downstream of FPG DNA glycosylase/lyase during repair of DNA containing N7-meG. (A–C) Double-stranded oligonucleotide substrates (20 nM) containing either a single me-FAPy-G:C (A) or an N7-meG:C pair (B and C) were incubated with WT, *fpg*^{-/-}, or *zdp*^{-/-} *Arabidopsis* cell-free extracts for 16 h at 37 °C. Then, MgCl₂ (2 mM) was added to reactions and incubation continued for 1 h. When indicated, His-ZDP protein (1.8 nM) was added to *zdp*^{-/-} extracts. All reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. (D) Pull-down assays using either His-FPG (Upper) or MBP-ZDP protein (Lower) as baits. (E) MMS sensitivity assay. *Arabidopsis* seedlings were grown in MS nutrient agar containing increasing concentrations of MMS and photographs were taken after 14 d of growth.

FPG Incises AP Sites Generated by Spontaneous Depurination of N7-meG. We next examined in detail the role of FPG during repair of DNA containing N7-meG. As indicated above, N7-meG may undergo either spontaneous depurination to generate an AP site or imidazole-ring opening to yield me-FAPy-G. We therefore tested the activity of *Arabidopsis* FPG protein against N7-meG and its two derivatives (Fig. 2). Control reactions confirmed that N7-meG was only incised by the simultaneous addition of hAAG and hAPE1, me-FAPy-G was processed by *E. coli* Fpg, and the AP site was incised by hAPE1 (Fig. 2A, lanes 5, 8, and 11, respectively). We found that *Arabidopsis* FPG did not display detectable incision activity against either N7-meG or me-FAPy-G (Fig. 2A, lanes 4 and 7). However, it efficiently incised the AP

site, generating as a product a DNA repair intermediate with a 3'-P terminus (Fig. 2A, lane 10). The robust AP lyase activity of *Arabidopsis* FPG has been previously reported (31). It has been described that a truncated form of *Arabidopsis* FPG processes me-FAPy-G with low efficiency (43), but we could not detect such activity, either with the full-length enzyme or with cell extracts, at least under our experimental conditions.

We therefore hypothesized that, during DNA repair reactions with cell extracts, spontaneous depurination of N7-meG generates AP sites that are substrates for FPG. To test this idea, we preincubated a DNA duplex with a single N7-meG residue during different time periods in the absence of cell extract and then submitted DNA either to an alkali treatment at 70 °C or to

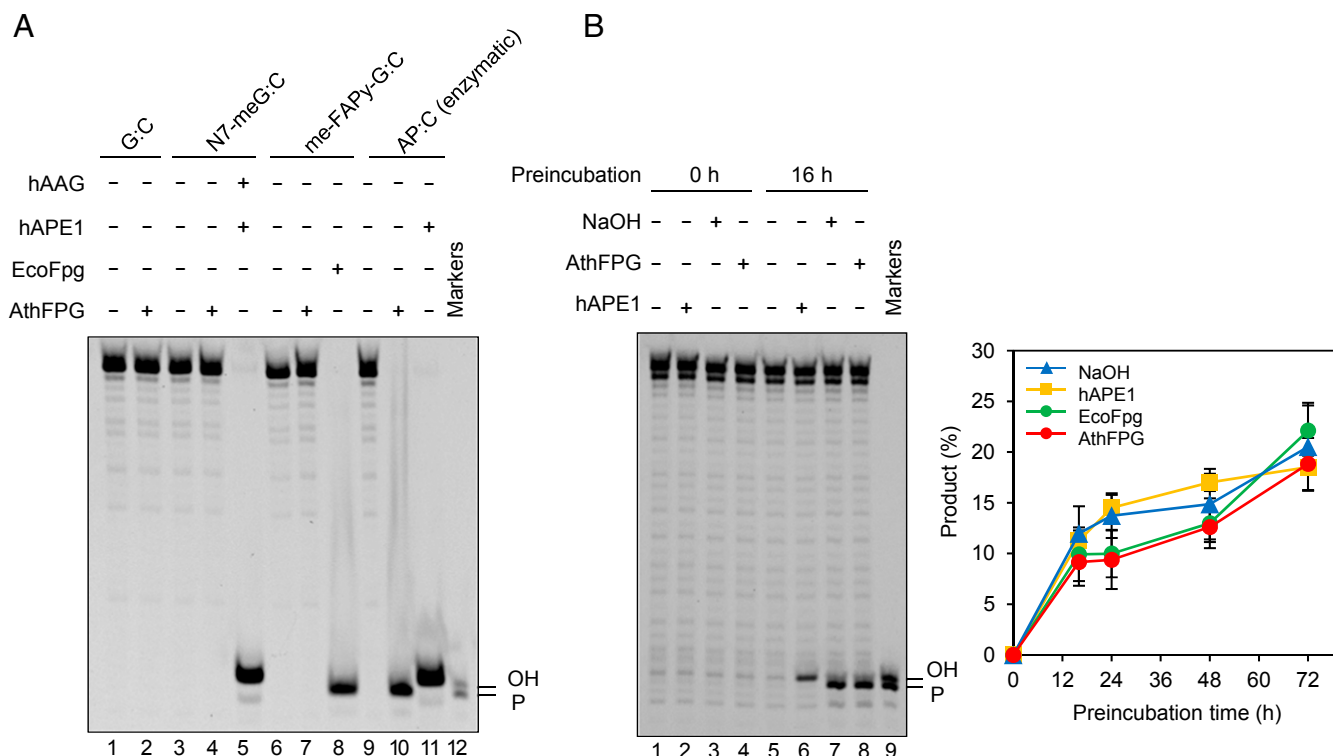


Fig. 2. FPG incises AP sites generated by spontaneous depurination of N7-meG. (A) Double-stranded oligonucleotide substrates (20 nM) containing a single lesion opposite C (N7-meG, me-FAPy-G, or AP site generated by uracil excision) were incubated for 2 h at 37 °C with *Arabidopsis* FPG (10 nM), hAPE1 (1 U), hAAG (2 U), or *E. coli* Fpg (8 U). (B) A double-stranded oligonucleotide substrate containing a single N7-meG:C pair was preincubated in DNA incision assay buffer (Methods) at 37 °C for the indicated times and then treated with human APE1 (1 U), *E. coli* Fpg (8 U), or *Arabidopsis* FPG (10 nM) for 1 h at 37 °C, or with NaOH (15 mM) for 10 min. at 70 °C. After stabilization with NaBH₄, reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. Values are means with SEs from three independent experiments.

incubation with hAPE1, *E. coli* Fpg, or *Arabidopsis* FPG. We found that alkali/heat-labile sites sensitive to all three enzymes accumulated in DNA at position 28 (Fig. 2B). The observed accumulation rate is compatible with that reported for depurination of N7-meG in dsDNA at neutral pH and 37 °C (7). As expected for AP sites, incision by hAPE1 generated 3'-OH termini whereas incision by *Arabidopsis* FPG or heat/alkali treatment generated 3'-P termini (Fig. 2B). Altogether, these results suggest that FPG enzyme present in *Arabidopsis* cell extracts efficiently processes AP sites generated by spontaneous depurination of N7-meG, but it is not active either on N7-meG itself or its me-FAPy-G derivative.

ARP, the Major *Arabidopsis* AP Endonuclease, Plays a Negligible Role in the Repair of Depurinated N7-meG. We next examined the relative roles of FPG and ARP in the repair of AP sites generated by spontaneous depurination of N7-meG. We first analyzed the level of AP endonuclease and AP lyase activity in cell extracts from WT, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-}, and double *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} mutant plants. Equivalent cell extract quality and DNA repair competence were previously verified by measuring UDG activity on a DNA duplex containing a U:C mismatch (Fig. S2). We then incubated cell extracts with a DNA substrate containing an AP site opposite C generated by uracil excision (Fig. 3, Left). To mimic the partial depurination of DNA containing N7-meG (discussed below), heteroduplex DNA with the enzymatically generated AP:C was mixed with homoduplex G:C at a 1:9 ratio before initiating repair reactions. We found that *arp*^{-/-} extracts catalyzed AP incision with efficiency similar to WT extracts, either in the absence or the presence of Mg²⁺ (Fig. 3, lanes 2 and 3 and 7 and 8). This result indicates that *arp*^{-/-} extracts only exhibit AP lyase activity, which is Mg²⁺-independent. However, *fpg*^{-/-} extracts also cata-

lyzed AP incision at levels comparable to those of WT extracts, but only in the presence of Mg²⁺ (Fig. 3, lanes 4 and 9). This result indicates that they only exhibit AP endonuclease activity, which is Mg²⁺-dependent. No AP incision activity was detected in *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} mutant extracts, although limited spontaneous hydrolysis was detected in the form of β -elimination products (Fig. 3, lanes 5 and 10). These results indicate that the only AP lyase and AP endonuclease activities detectable in *Arabidopsis* cell extracts under the experimental conditions used are FPG and ARP, respectively.

We next performed analogous repair reactions with a DNA substrate containing depurinated N7-meG (Fig. 3, Right). Depurination was achieved by preincubating a DNA duplex containing N7-meG in the absence of cell extracts for 16 h (Fig. 2B and Methods). As previously observed (Fig. 1B), we found that in the absence of Mg²⁺, WT extracts generated a product with a 3'-P terminus that was converted into a 3'-OH end upon Mg²⁺ addition (Fig. 3, lanes 14 and 19), whereas *fpg*^{-/-} extracts did not catalyze any incision, either in the absence or the presence of Mg²⁺ (Fig. 3, lanes 16 and 21). In contrast, *arp*^{-/-} mutant extracts displayed an incision pattern very similar to that of WT plants (Fig. 3, lanes 15 and 20). Extracts from double *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} mutant plants did not display any detectable incision activity (Fig. 3, lanes 17 and 22). Altogether, these results indicate that incision of depurinated N7-meG in *Arabidopsis* cell extracts is ARP-independent and it is carried out exclusively by FPG.

Depurinated N7-meG Is Repaired Through FPG-Dependent SP-BER. It has been previously suggested that BER initiated by monofunctional DNA glycosylases continues via both SP- and LP-BER, whereas that initiated by bifunctional DNA glycosylases/lyases

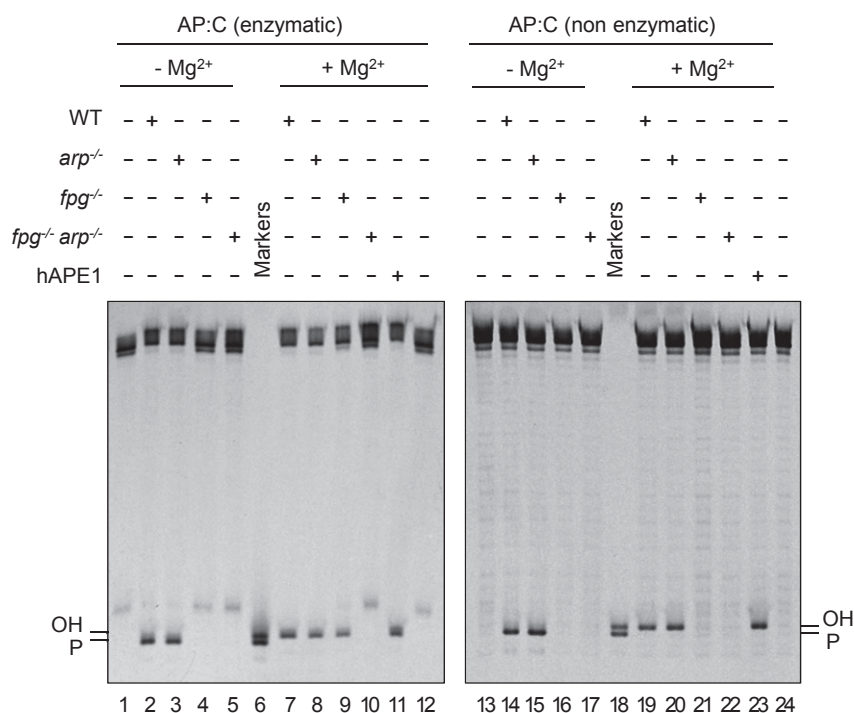


Fig. 3. ARP plays a negligible role in repair of depurinated N7-meG. DNA substrates (20 nM) were a 9:1 mixture of homoduplex G:C and heteroduplex AP:C generated either by uracil excision (enzymatic AP:C, *Left*) or by spontaneous N7-meG depurination (nonenzymatic AP:C, *Right*). Similar concentrations of each type of AP site were verified by incision with hAPE1 (10 U) (lanes 11 and 23). Substrates were incubated with *Arabidopsis* cell-free extracts (8 μ g) for 1 h at 37 °C. After stabilization with NaBH₄, reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning.

continues primarily via SP-BER (18). Since repair of depurinated N7-meG is AP lyase-dependent and AP endonuclease-independent we hypothesized that it should mainly involve SP-BER. To test this idea, we performed gap-filling DNA repair reactions either in the presence of dGTP or all four dNTPs (Fig. 4).

When gap-filling DNA repair reactions were performed with DNA containing an AP site generated by uracil excision, WT, *arp*^{-/-}, and *fpg*^{-/-} extracts catalyzed the insertion of up to three deoxynucleotides when all four dNTPs were present in the repair

reaction (Fig. 4, lanes 6, 9, and 12), suggesting the operation of an LP-BER. As expected, no DNA repair intermediates were detected with double mutant *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} extracts (Fig. 4, lanes 13–15). Since only FPG and ARP activities are detectable in *arp*^{-/-} and *fpg*^{-/-} extracts, respectively (Fig. 3), these results suggest that the nature of the enzyme performing AP incision is not the only factor influencing the choice between SP- and LP-BER.

When reactions catalyzed by WT extracts were performed with DNA containing depurinated N7-meG the insertion of just one

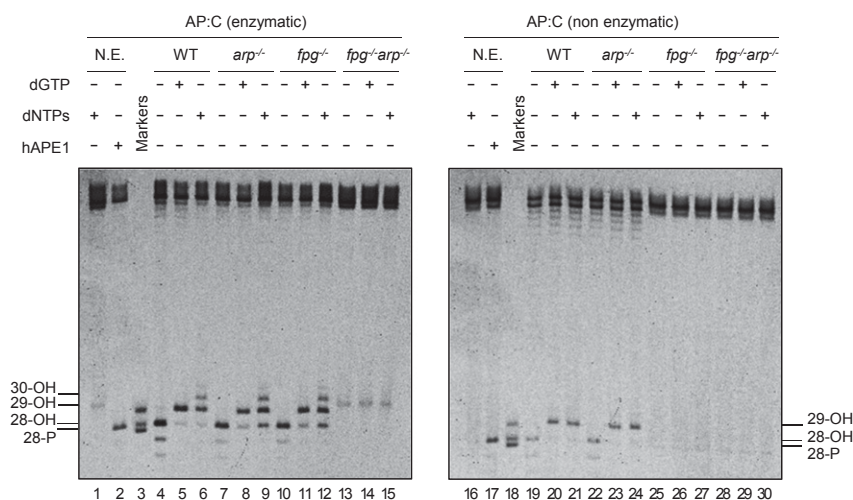


Fig. 4. Depurinated N7-meG is repaired through FPG-dependent SP-BER. DNA substrates (20 nM) were a 9:1 mixture of homoduplex G:C and heteroduplex AP:C generated either by uracil excision (enzymatic AP:C, *Left*) or by spontaneous N7-meG depurination (nonenzymatic AP:C, *Right*). Similar concentrations of each type of AP site were verified by incision with hAPE1 (10 U) (lanes 2 and 17). Substrates were incubated with *Arabidopsis* cell-free extracts (8 μ g) for 1 h at 37 °C with or without either dGTP or all four dNTPs. After stabilization with NaBH₄, reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. N.E., nonextract.

deoxynucleotide was detected, regardless of the presence of only dGTP or all four dNTPs in the repair reaction (Fig. 4, lanes 20 and 21). The same insertion pattern was observed with *arp*^{-/-} mutant cell extracts, which only exhibit FPG incision activity (Fig. 4, lanes 23 and 24). As expected, no DNA repair intermediates were detected with either single mutant *fpg*^{-/-} or double mutant *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} extracts (Fig. 4, lanes 25–30). These results suggest that depurinated N7-meG is repaired through FPG-dependent SP-BER.

ARP Discriminates Between AP Sites Generated by Enzymatic and Nonenzymatic Release of N7-meG. The results described above suggested that nonenzymatic hydrolysis of N7-meG channels repair into an AP endonuclease-independent pathway. To test this idea, we compared the incision activity of recombinant and native FPG and ARP on DNA substrates containing AP sites generated either by enzymatic or nonenzymatic release of N7-meG (Fig. 5). We found that recombinant FPG incised both types of DNA substrates with similar efficiency (Fig. 5A). Native FPG enzyme present in *arp*^{-/-} mutant extracts, which, as previously shown (Fig. 3) only display FPG-dependent AP incision activity, was also active on both types of AP sites (Fig. 5B). When tested on the same DNA substrates recombinant ARP-incised AP sites generated by enzymatic release of N7-meG but, unexpectedly, did not display detectable activity on AP sites generated by spontaneous depurination of N7-meG (Fig. 5C). Mutant *fpg*^{-/-} extracts, which only show ARP-dependent AP incision activity (Fig. 3), were also active on enzymatic AP sites but lacked activity on nonenzymatic AP sites (Fig. 5D). Importantly, recombinant hAPE1 did not exhibit such differential activity (Fig. S3). Altogether, these results indicate that ARP discriminates between AP sites generated by enzymatic and nonenzymatic release of N7-meG.

The Identity of the Base Opposite an Enzymatically Generated AP Site Influences Both AP Endonuclease and AP Lyase Activities. The results described above indicate that both ARP and FPG are active on enzymatically generated AP sites, regardless of whether the excised base is either N7-meG or uracil. It is important to emphasize that all previous experiments were performed using C as the opposite base in the complementary strand. However, the relevant *in vivo* lesions arising from enzymatic excision of N7-meG and uracil (deaminated cytosine) are expected to be AP sites opposite C and G, respectively. To further explore the substrate preferences of the major AP incision activities in *Arabidopsis* we tested the effect of the base identity, either C or G, opposite an enzymatically generated AP site. We compared the incision activity of purified recombinant ARP and FPG proteins on DNA substrates containing AP sites generated by excision of uracil opposite either C or G (Fig. 6). Whereas FPG displayed similar activity on both DNA substrates (Fig. 6A), ARP activity was higher on AP sites opposite G (Fig. 6C). Native ARP in *fpg*^{-/-} extracts (Fig. 6D) and recombinant hAPE1 (Fig. S4) also exhibited a similar preference for G as the orphan base. Interestingly, and unlike recombinant FPG, native FPG activity detected in *arp*^{-/-} extracts was higher on AP sites opposite C (Fig. 6B). Altogether, these results suggest that the identity of the base opposite an enzymatically generated AP site influences the choice between AP endonuclease- and AP lyase-dependent repair.

Discussion

The initial motivation of this study was to understand why *zdp*^{-/-} mutant plants are hypersensitive to MMS. Our biochemical and genetic analysis strongly suggests that the nonenzymatic release of MMS-induced N7-meG channels repair into an AP endonuclease-independent pathway in which FPG and ZDP perform consecutive steps (Fig. 7). The fact that FPG inactivation in *zdp*^{-/-} mutants partially restores MMS resistance (Fig. 1E) suggests that the SSB intermediates with blocked 3'-P ends generated by FPG

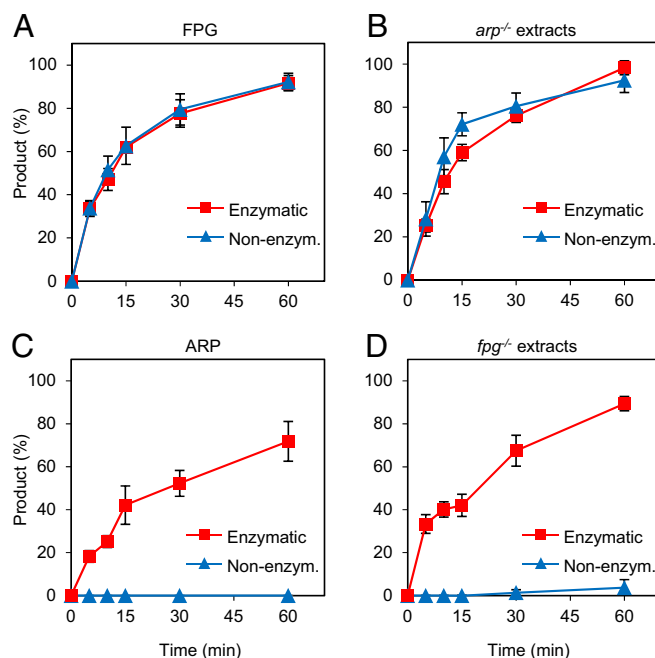


Fig. 5. ARP discriminates between AP sites generated by enzymatic and nonenzymatic release of N7-meG. DNA substrates (20 nM) were a 9:1 mixture of homoduplex G:C and heteroduplex AP:C generated either by spontaneous N7-meG depurination (nonenzymatic, blue triangles), or N7-meG excision by hAAG (enzymatic, red squares). Substrates were incubated either with purified proteins [(A) FPG: 0.5 nM; (C) ARP: 10 nM] or *Arabidopsis* cell-free extracts [(B) *arp*^{-/-}: 8 μg; (D) *fpg*^{-/-}: 8 μg]. Reactions for detection of AP endonuclease activity (C and D) were supplemented with 2 mM MgCl₂. After stabilization with NaBH₄, reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. Values are means with SEs from three independent experiments.

are more cytotoxic than AP sites. A similar observation has been previously reported in *S. cerevisiae*, where deletion of its two Nth homologs (NTG1 and NTG2) partially rescues the MMS hypersensitivity of a double *apn1 apn2* mutant, presumably by avoiding accumulation of 3'-PUA ends (37). In *S. pombe*, the deletion of *nth1* also relieves the MMS sensitivity of the single *apn2* mutant (35). Our results suggest that it would be interesting to examine the relative activities of yeast AP lyases and AP endonucleases on AP sites of enzymatic and nonenzymatic origin.

Unlike the yeast pathway, where AP endonucleases are required to process the 3'-PUA blocking ends generated by Nth homologs, the *Arabidopsis* pathway described here is AP endonuclease-independent, since 3'-P ends generated by FPG are processed by ZDP DNA 3'-phosphatase. This scenario is reminiscent of the AP endonuclease-independent pathway reported for oxidatively damaged bases in mammalian cells (21), in which NEIL1 and NEIL2 DNA glycosylases generate DNA strand breaks with 3'-P termini that are processed by the ZDP homolog polynucleotide kinase (PNK). Interestingly, PNK-deficient cells are sensitive to MMS (44), thus raising the possibility that the mammalian NEIL/PNK pathway may also operate in the repair of depurinated N7-meG. It has also been suggested that a PNK-dependent pathway functions as a backup mechanism for AP site repair in *S. pombe* (45, 46).

An unexpected observation arising from our work is that, unlike its mammalian homolog APE1, *Arabidopsis* ARP endonuclease does not exhibit detectable activity on abasic sites arising from N7-meG depurination (Fig. 5C and D). We propose that such incapacity underlies the critical function of the FPG/ZDP pathway in protection of *Arabidopsis* against MMS. However, it is likely that ARP plays a role in the repair of AP sites generated by enzymatic

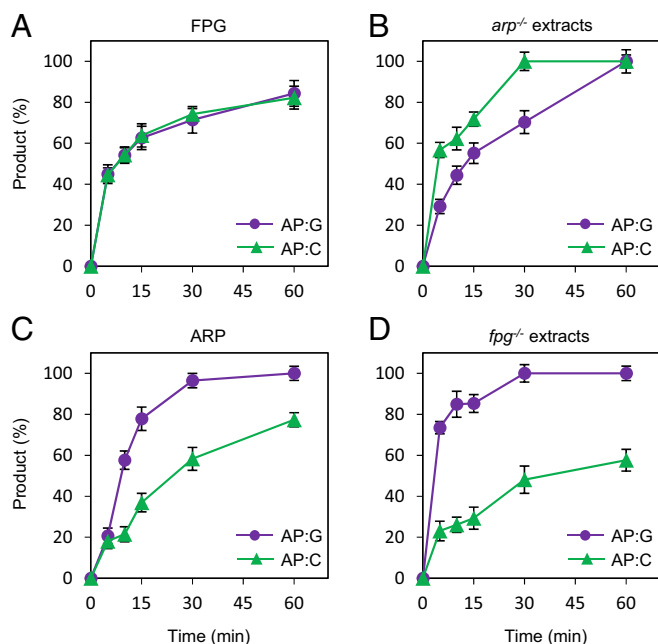


Fig. 6. Identity of the base opposite the abasic site influences the choice between AP endonuclease- and AP lyase-mediated repair. DNA substrates (2 nM) contained either a single AP:G (purple circles) or AP:C (green triangles), both generated by uracil excision. Substrates were incubated either with purified proteins [(A) FPG: 0.5 nM; (C) ARP: 10 nM] or *Arabidopsis* cell-free extracts [(B) *arp*^{-/-}: 8 μg; (D) *fpg*^{-/-}: 8 μg]. Reactions for detection of AP endonuclease activity (C and D) were supplemented with 2 mM MgCl₂. After stabilization with NaBH₄, reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. Values are means with SEs from two independent experiments.

excision of alkylated bases. In fact, *fpg*^{-/-} mutant extracts, which only display ARP-dependent AP incision activity, are active on AP sites generated by N7-meG excision (Fig. 5D). Moreover, the simultaneous deficiency of FPG and ARP causes a hypersensitivity to MMS similar to that of single *zdp*^{-/-} mutants (Fig. 1E). Although we could not detect N7-meG excision in cell extracts, the *Arabidopsis* genome encodes homologs of enzymes that excise N7-meG, such as *E. coli* AlkA and human AAG (47, 48). In any case, AP sites generated by such alkylpurine DNA glycosylases would also be substrates for the potent AP lyase activity of FPG (Figs. 5 and 7).

The absolute preference of ARP for enzymatically generated AP sites in comparison with those generated by nonenzymatic release (Fig. 5 C and D) deserves further investigation, particularly since its mammalian homolog does not exhibit such discrimination (Fig. S3). ARP and APE1 are members of the exonuclease III (ExoIII) family of AP endonucleases (49) and share a 57% sequence identity in their respective catalytic DNA repair domains (50). Both proteins have N-terminal extensions absent from *E. coli* ExoIII, with a length of 61 extra residues in APE1 and 270 residues in ARP (50). The N-terminal domain of APE1 is required for a redox activity that is independent of the DNA repair function (51). Although there is no sequence conservation between the N-terminal extensions of both proteins, it has been reported that ARP possesses a redox function similar to that of APE1 (52). However, the redox domain of APE1 is less well-defined than the DNA repair domain, and they overlap in a region that contains some residues conserved in both ARP and APE1 (53).

The negligible activity of ARP against N7-meG depurination products strongly suggests that AP sites generated by spontaneous hydrolysis and those generated by monofunctional DNA glycosylases have differential features not yet identified. Observed kinetic isotope effects, pH dependencies, and structure–reactivity

comparisons suggest that enzymatic and nonenzymatic glycosidic bond cleavage follow the same reaction coordinate, with an oxocarbenium ion-like transition state (54–56). However, detailed transition-state analysis of nonenzymatic N-glycoside hydrolysis of deoxynucleosides has been reported only for dAMP (reviewed in ref. 56). The chemical instability of abasic sites poses a challenge for biochemical and structural studies. AP sites exist in an equilibrium mixture of four species, with ~99% as two hemiacetal anomers (α- and β-2-deoxy-D-ribofuranose) and 1% as ring-opened aldehyde and hydrated aldehyde forms (57, 58). Since the aldehyde forms are prone to spontaneous cleavage by β-elimination, most biochemical, thermodynamic, and structural studies have been performed using a stable analog containing a tetrahydrofuran (THF) moiety lacking the hydroxyl group at C-1 of 2-deoxyribose (59). A derivative retaining such group but with the 3'-phosphate replaced by methylene (3CAPS) has also been suggested as a useful AP-site analog (60). However, both THF and 3CAPS are refractory to incision by AP lyases (60). Structural models of THF in naked DNA reveal an intrahelical conformation of the deoxyribose moiety (reviewed in ref. 9). In contrast, studies with genuine AP sites generated by UDG treatment of uracil-containing DNA have reported extrahelical conformations either for the β-anomer (61) or for both anomeric forms (62). Interestingly, it has been suggested that the ratio of the anomeric forms may depend upon the identity of the base in the complementary strand

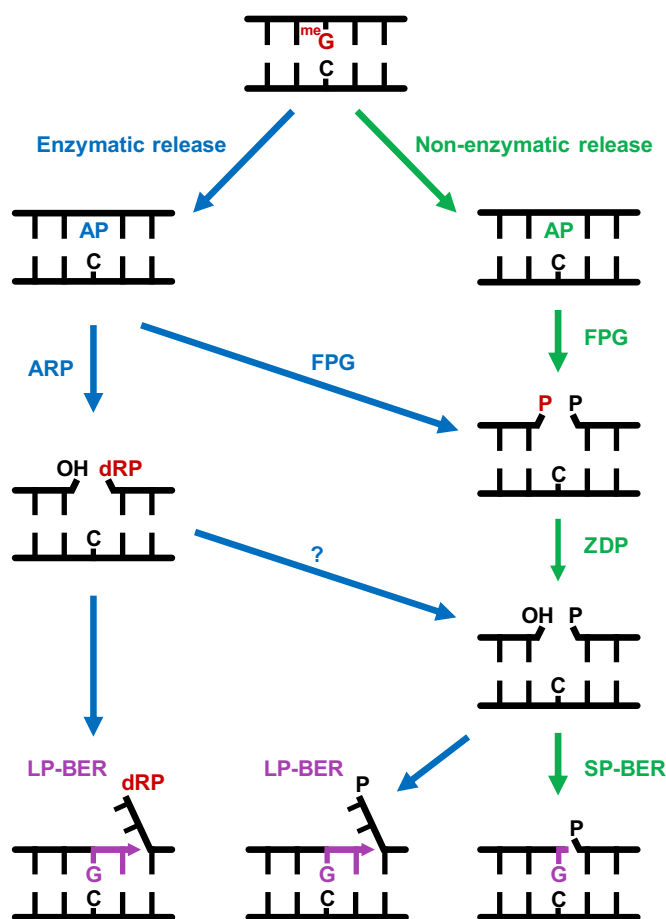


Fig. 7. A model for repair of AP sites arising from enzymatic and nonenzymatic release of N7-meG. FPG incises AP sites generated by spontaneous release of N7-meG, generating a single-nucleotide gap with a 3'-P terminus that is processed by ZDP to generate a 3'-OH terminus. Repair is continued through SP-BER. AP sites generated by enzymatic release of N7-meG may be incised by both ARP and FPG, and repair may be continued by either SP- or LP-BER. See text for details.

(8, 57). AP sites have been also generated in oligonucleotides by thermal depurination of either normal (63) or alkylated purines (64), but unfortunately there are no reports on their structure. Our results suggest that direct structural comparison between enzymatically and nonenzymatically generated AP sites, in the same sequence context and conditions, will be essential to fully understand the biological consequences of this ubiquitous lesion.

Methods

Plant Material and Growth Conditions. The *Arabidopsis* mutant line SALK_076932 harboring a T-DNA insertion in the *FPG* gene was obtained from the *Arabidopsis* Biological Resource Center. Homozygous plants for the T-DNA insertion were identified by PCR using primers FPG_F1, FPG_R5, and LBA_3 (Table S1). *Arabidopsis arp*^{-/-} (SALK_021478) and *zdp*^{-/-} (SAIL_60_C08) lines were previously described (23, 25). All T-DNA insertion mutants were in the Col-0 background. Double *fpg*^{-/-} *zdp*^{-/-} and *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} mutant lines were obtained by crossing homozygous *fpg*^{-/-}, *zdp*^{-/-} and *arp*^{-/-} plants and self-crossing the progeny. F2 plants were genotyped by PCR using specific primers for *FPG* (FPG_F1, FPG_F5, and LBA1), *ARP* (ARP_F1, ARP_R1, and LBA1), and *ZDP* (ZDP_F1, ZDP_R1, and LB3) loci (Table S1).

Arabidopsis WT (Col-0) and mutant plants were grown in pots in a growth chamber at 23 °C under long-day conditions (16 h light, 8 h darkness). For in vitro culture, sterilized seeds were cold-treated at 4 °C for 2 d and plated on 10-cm Petri dishes containing 25 mL of 0.44% (wt/vol) MS medium (Sigma) supplemented with 3% (wt/vol) sucrose and 0.8% (wt/vol) agar, pH 5.8. Plates were transferred to the growth chamber and incubated under long-day conditions at 23 °C. For genotoxic treatments, plants were grown in MS nutrient agar containing increasing concentrations of MMS (Sigma).

Arabidopsis Cell Extract Preparation. Whole-cell extracts were prepared from snap-frozen 15-d-old seedlings grown in Petri dishes as described above. All steps were performed at 0–4 °C. Frozen plant material was ground in a hand mortar with liquid N₂, and the resulting powder was resuspended in two to three volumes (wt/vol) of homogenization buffer containing 25 mM Hepes-KOH, pH 7.8, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, 10% glycerol, 1 mM DTT, and 1 μL·mL⁻¹ protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich). The homogenate was incubated for 30 min at 4 °C and centrifuged at 11,400 × *g* for 1 h. The supernatant was filtered through a 20-μm nylon mesh and dialyzed overnight against 25 mM Hepes-KOH, pH 7.8, 100 mM KCl, 17% glycerol, and 2 mM DTT. Protein concentration was determined by the Bradford assay, and the extract was stored in small aliquots at –80 °C.

DNA Substrates. Oligonucleotides used as DNA substrates (Table S2) were synthesized by IDT and purified by PAGE before use. Double-stranded DNA substrates were prepared by mixing a 5 μM solution of a 5'-fluorescein (Fl)-labeled oligonucleotide with a 10 μM solution of an unlabeled complementary oligonucleotide. Annealing reactions were carried out by heating at 95 °C for 5 min followed by slowly cooling to room temperature.

DNA duplex containing a single N7-meG was synthesized by the primer extension method (40) using a 5'-fluorescein-labeled 28-nt oligonucleotide annealed to a 51-nt oligonucleotide (Table S2). DNA synthesis was performed in a reaction mixture containing 0.1 U·μL⁻¹ Klenow Fragment (3'→5' exo⁻, NEB), 20 μM dCTP, 20 μM dATP, 20 μM dTTP, and 200 μM 7-methyl-dGTP (Jena Bioscience) at 37 °C for 1 h in NEBuffer 2. A control DNA substrate was synthesized in presence of 20 μM dGTP instead of 7-methyl-dGTP. Reactions were stopped by adding 10 mM EDTA, and DNA was ethanol-precipitated at –20 °C in the presence of 0.3 mM NaCl and 16 mg·mL⁻¹ glycogen. Samples were resuspended in deionized water and stored at –20 °C. The N7-meG was converted into its ring-opened me-FAPy-G form by incubating in 50 mM phosphate buffer (pH 11) at 37 °C for 5 h (65). DNA was ethanol-precipitated as described above.

DNA substrates containing an enzymatic AP site were generated by incubating a DNA duplex containing either a U:G or a U:C mismatch, prepared as described above, with *E. coli* UDG (1.5 U; New England BioLabs, NEB) at 37 °C for 1 h. Enzymatic AP sites were also generated by incubating a DNA duplex containing a N7-meG:C pair with hAAG (2 U; NEB), at 37 °C for 8 h in NEBuffer 1. DNA substrates containing an AP site generated by spontaneous depurination were generated by incubating a DNA duplex with a single N7-meG:C pair for 16 h at 37 °C in DNA incision assay buffer (45 mM Hepes-KOH, pH 7.8, 70 mM KCl, 1 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 36 μg BSA, and 0.2% glycerol).

Validation of DNA Substrates Containing N7-meG and Me-FAPy-G. DNA substrates (20 nM) containing N7-meG or me-FAPy-G were validated in reactions (50 μL) with hAAG (2 U; NEB), hAPE1 (1 U; NEB), or *E. coli* Fpg (EcoFpg, 8 U; NEB). Incubations were performed at 37 °C for 8 h in NEBuffer 1 (hAAG and

hAPE1) or ThermoPol Reaction Buffer (EcoFpg). DNA was extracted with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and ethanol-precipitated as described above. Samples were resuspended in 10 μL of 90% formamide and heated at 50 °C for 5 min. Reaction products were separated in a 12% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea. Labeled DNA was visualized using FLA-5100 imager and analyzed using Multigauge software (Fujifilm).

DNA Incision Assay. Reactions (50 μL) contained 45 mM Hepes-KOH, pH 7.8, 70 mM KCl, 1 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 36 μg BSA, 0.2% glycerol, DNA substrate (2 or 20 nM), the indicated amount of cell extract or protein, and, when specified, MgCl₂ (2 mM). After incubation at 37 °C during the indicated time, reactions were stopped by adding 20 mM EDTA, 0.6% SDS, and 0.5 mg·mL⁻¹ proteinase K, and mixtures were incubated at 37 °C for 30 min. When indicated, reaction products were stabilized by the addition of freshly prepared sodium borohydride (NaBH₄; Sigma-Aldrich) to a final concentration of 230 mM and incubated at 0 °C for 30 min. Finally, samples were buffered with 100 mM Tris, pH 8, and DNA was extracted as described above. Reaction products were separated and visualized as previously described.

For assays comparing enzymatic and nonenzymatic AP sites, DNA substrates (20 nM) were a 9:1 mixture of homoduplex G:C and heteroduplex AP:C. Nonenzymatic AP:C was generated by spontaneous N7-meG depurination for 16 h, whereas enzymatic AP:C was generated either by N7-meG excision by hAAG or uracil excision by *E. coli* UDG (discussed above). Product (percent) was calculated as the incision fragments detected relative to those generated by hAPE1 (10 U).

Gap-Filling Assay. Reactions (50 μL) contained 45 mM Hepes-KOH, pH 7.8, 70 mM KCl, 1 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 36 μg BSA, 1 mM NAD, 0.2% glycerol, 10 mM ATP, 110 mM phosphocreatine, 0.25 μg·mL⁻¹ creatine phosphokinase, 2 mM MgCl₂, and 20 μM of the indicated deoxynucleotides. After incubation at 37 °C for 3 h, reactions were stopped, DNA was extracted, and samples were processed as described above.

Protein Expression and Purification. *Arabidopsis FPG* cDNA, a gift from Scott Kathe and Susan Wallace, University of Vermont, Burlington, VT (31), was subcloned into pET30b expression vector (Novagen) using XhoI and XbaI sites. Expression was carried out in *E. coli* BL21 (DE3) *dcm*⁻ Codon Plus cells (Stratagene) induced during 2 h by adding 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside. His-FPG was purified by affinity chromatography on a Ni²⁺-Sepharose column (HisTrap HP; GE Healthcare). Protein was eluted with a 60 mM to 1 M gradient of imidazole and analyzed by SDS/PAGE (10%) using broad-range molecular weight standards (Bio-Rad). Protein concentration was determined by the Bradford assay. His-ZDP, MBP-ZDP, and His-ARP were expressed and purified as previously described (23, 25).

Pull-Down Assays. For His-FPG pull-down, 30 pmol of purified MBP or MBP-ZDP in 30 μL of column buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 10 mM β-mercaptoethanol) was added to 100 μL of amylose resin (NEB) and incubated for 1 h at 4 °C. The resin was washed three times with 1 mL of binding buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 10 mM β-mercaptoethanol). Purified His-FPG (5 pmol) was incubated at 25 °C for 30 min at 450 rpm with either MBP or MBP-ZDP bound to resin. The resin was washed three times with 1 mL of washing buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 1.5% Triton X-100, and 250 mM NaCl). Bound proteins were analyzed by Western blot using antibodies against His₆ tag (Santa Cruz).

For MBP-ZDP pull-down, 30 pmol of purified His-FPG in 30 μL of dialysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 1 mM DTT) was added to 100 μL of Ni²⁺ Sepharose resin (NEB) and incubated for 1 h at 4 °C. The resin was washed three times with 1 mL of binding buffer 2 (10 mM Tris, pH 8, 1 mM DTT, 0.01 mg·mL⁻¹ BSA, and 60 mM Imidazol). Purified MBP or MBP-ZDP (5 pmol) was incubated at 25 °C for 30 min at 450 rpm with His-FPG bound to resin. The resin was washed three times with 1 mL of washing buffer 2 (20 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, and 60 mM imidazol). Bound proteins were analyzed by Western blot using antibodies against MBP tag (Santa Cruz).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank S. D. Kathe and S. S. Wallace (University of Vermont) for the kind gift of *Arabidopsis FPG* cDNA, Ana M. Maldonado and Jesús V. Jorrián (University of Córdoba) for generously sharing plant-growing facilities, and Jara Teresa Parrilla-Doblas (University of Córdoba) for assistance with FPG purification. This study was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and the European Regional Development Fund under Grant BFU2016-80728-P and by the Junta de Andalucía and the European Regional Development Fund under Grant P11-CVI-7576. C.B. was the recipient of a PhD FPI (Formación de Personal Investigador) Fellowship from the Junta de Andalucía, Spain.

1. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.
2. Lindahl T, Nyberg B (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11:3610–3618.
3. Lindahl T (1979) DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 22:135–192.
4. Krokan HE, Björås M (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a012583.
5. Talpaert-Borlé M (1987) Formation, detection and repair of AP sites. *Mutat Res* 181: 45–56.
6. Strauss B, Hill T (1970) The intermediate in the degradation of DNA alkylated with a monofunctional alkylating agent. *Biochim Biophys Acta* 213:14–25.
7. Gates KS, Nooner T, Dutta S (2004) Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chem Res Toxicol* 17:839–856.
8. Beger RD, Bolton PH (1998) Structures of apurinic and apyrimidinic sites in duplex DNAs. *J Biol Chem* 273:15565–15573.
9. Lhomme J, Constant JF, Demeunynck M (1999) Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers* 52:65–83.
10. Boiteux S, Guillet M (2004) Abasic sites in DNA: Repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 3:1–12.
11. Demple B, Harrison L (1994) Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63:915–948.
12. Seeberg E, et al. (2000) Base removers and strand scissors: Different strategies employed in base excision and strand incision at modified base residues in DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:135–142.
13. Levin JD, Demple B (1990) Analysis of class II (hydrolytic) and class I (beta-lyase) apurinic/apyrimidinic endonucleases with a synthetic DNA substrate. *Nucleic Acids Res* 18:5069–5075.
14. Fortini P, Dogliotti E (2007) Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6:398–409.
15. Córdoba-Cañero D, Morales-Ruiz T, Roldán-Arjona T, Ariza RR (2009) Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants. *Plant J* 60:716–728.
16. Prasad R, Beard WA, Strauss PR, Wilson SH (1998) Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem* 273:15263–15270.
17. Srivastava DK, et al. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem* 273:21203–21209.
18. Fortini P, Parlanti E, Sidorkina OM, Laval J, Dogliotti E (1999) The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 274:15230–15236.
19. Pascucci B, et al. (2002) Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins. *Nucleic Acids Res* 30:2124–2130.
20. Li Y, et al. (2015) An AP endonuclease functions in active DNA demethylation and gene imprinting in *Arabidopsis* [corrected]. *PLoS Genet* 11:e1004905, and erratum (2015) 11:e1005198.
21. Wiederhold L, et al. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* 15:209–220.
22. Córdoba-Cañero D, Roldán-Arjona T, Ariza RR (2014) *Arabidopsis* ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. *Plant J* 79:824–834.
23. Martínez-Macias MI, et al. (2012) A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 45:357–370.
24. Córdoba-Cañero D, Dubois E, Ariza RR, Doutriaux MP, Roldán-Arjona T (2010) *Arabidopsis* uracil DNA glycosylase (UNG) is required for base excision repair of uracil and increases plant sensitivity to 5-fluorouracil. *J Biol Chem* 285:7475–7483.
25. Córdoba-Cañero D, Roldán-Arjona T, Ariza RR (2011) *Arabidopsis* ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J* 68:693–702.
26. Ramiro-Merina Á, Ariza RR, Roldán-Arjona T (2013) Molecular characterization of a putative plant homolog of MBD4 DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* 12:890–898.
27. Roldán-Arjona T, García-Ortiz MV, Ruiz-Rubio M, Ariza RR (2000) cDNA cloning, expression and functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *Escherichia coli* DNA repair enzyme endonuclease III. *Plant Mol Biol* 44:43–52.
28. Ohtsubo T, et al. (1998) Molecular cloning of AtMMH, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli* mutM gene, and analysis of functional domains of its product. *Mol Gen Genet* 259:577–590.
29. García-Ortiz MV, Ariza RR, Roldán-Arjona T (2001) An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 47:795–804.
30. Dany AL, Tissier A (2001) A functional OGG1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 265:293–301.
31. Kathe SD, et al. (2009) Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases. *DNA Repair (Amst)* 8:643–653.
32. Morales-Ruiz T, et al. (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6853–6858.
33. Ortega-Galísteo AP, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldán-Arjona T (2008) *Arabidopsis* DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol* 67:671–681.
34. Murphy TM, Belmonte M, Shu S, Britt AB, Hatteroth J (2009) Requirement for abasic endonuclease gene homologues in *Arabidopsis* seed development. *PLoS One* 4:e4297.
35. Alseth I, Korvald H, Osman F, Seeberg E, Björås M (2004) A general role of the DNA glycosylase Nth1 in the abasic sites cleavage step of base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 32:5119–5125.
36. Sugimoto T, et al. (2005) Roles of base excision repair enzymes Nth1p and Apn2p from *Schizosaccharomyces pombe* in processing alkylation and oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 4:1270–1280.
37. Hanna M, et al. (2004) Involvement of two endonuclease III homologs in the base excision repair pathway for the processing of DNA alkylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 3:51–59.
38. Meadows KL, Song B, Doetsch PW (2003) Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: Implications for biological function. *Nucleic Acids Res* 31:5560–5567.
39. Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231:11–30.
40. Asaeda A, et al. (2000) Substrate specificity of human methylpurine DNA N-glycosylase. *Biochemistry* 39:1959–1965.
41. O'Brien PJ, Ellenberger T (2004) Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 279:9750–9757.
42. Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, Gouyette A, Laval J (1990) Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem* 265:3916–3922.
43. Dudos S, et al. (2012) Structural and biochemical studies of a plant formamidopyrimidine-DNA glycosylase reveal why eukaryotic Fpg glycosylases do not excise 8-oxoguanine. *DNA Repair (Amst)* 11:714–725.
44. Rasouli-Nia A, Karimi-Busheri F, Weinfeld M (2004) Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6905–6910.
45. Nilsen L, Forström RJ, Björås M, Alseth I (2012) AP endonuclease independent repair of abasic sites in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 40:2000–2009.
46. Kashkina E, Qi T, Weinfeld M, Young D (2012) Polynucleotide kinase/phosphatase, Pnk1, is involved in base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair (Amst)* 11:676–683.
47. Britt AB (2002) Repair of damaged bases. *The Arabidopsis Book*, eds Somerville C, Meyerowitz EM (Am Soc Plant Biol, Rockville, MD).
48. Santerre A, Britt AB (1994) Cloning of a 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2240–2244.
49. Demple B, Herman T, Chen DS (1991) Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11450–11454.
50. Gorman MA, et al. (1997) The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *EMBO J* 16:6548–6558.
51. Xanthoudakis S, Miao G, Wang F, Pan YC, Curran T (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J* 11:3323–3335.
52. Babychuk E, Kushnir S, Van Montagu M, Inzé D (1994) The *Arabidopsis thaliana* apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3299–3303.
53. Wilson DM, 3rd, Barsky D (2001) The major human abasic endonuclease: Formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* 485:283–307.
54. Stivers JT, Jiang YL (2003) A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases. *Chem Rev* 103:2729–2759.
55. O'Brien PJ, Ellenberger T (2003) Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines. *Biochemistry* 42:12418–12429.
56. Drohat AC, Maiti A (2014) Mechanisms for enzymatic cleavage of the N-glycosidic bond in DNA. *Org Biomol Chem* 12:8367–8378.
57. Manoharan M, et al. (1988) The characterization of abasic sites in DNA heteroduplexes by site specific labeling with carbon-13. *J Am Chem Soc* 110:1620–1622.
58. Wilde JA, Bolton PH, Mazumder A, Manoharan M, Gerlt JA (1989) Characterization of the equilibrating forms of the aldehydic abasic site in duplex DNA by oxygen-17 NMR. *J Am Chem Soc* 111:1894–1896.
59. Takeshita M, Chang CN, Johnson F, Will S, Grollman AP (1987) Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. Model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases. *J Biol Chem* 262:10171–10179.
60. Schuermann D, et al. (2016) 3CAPS-A structural AP-site analogue as a tool to investigate DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res* 44:2187–2198.
61. Goljer I, Kumar S, Bolton PH (1995) Refined solution structure of a DNA heteroduplex containing an aldehydic abasic site. *J Biol Chem* 270:22980–22987.
62. Hoehn ST, Turner CJ, Stubbe J (2001) Solution structure of an oligonucleotide containing an abasic site: Evidence for an unusual deoxyribose conformation. *Nucleic Acids Res* 29:3413–3423.
63. Vasseur JJ, Peoc'h D, Rayner B, Imbach JL (1991) Derivatization of oligonucleotides through abasic site formation. *Nucleosides Nucleotides* 10:107–117.
64. Coleman RS, Pires RM (1999) Site-specific formation of abasic lesions in DNA. *Nucleosides Nucleotides* 18:2141–2146.
65. Alekseyev YO, Hamm ML, Essigmann JM (2004) Aflatoxin B1 formamidopyrimidine adducts are preferentially repaired by the nucleotide excision repair pathway in vivo. *Carcinogenesis* 25:1045–1051.

Supporting Information

Barbado et al. 10.1073/pnas.1719497115

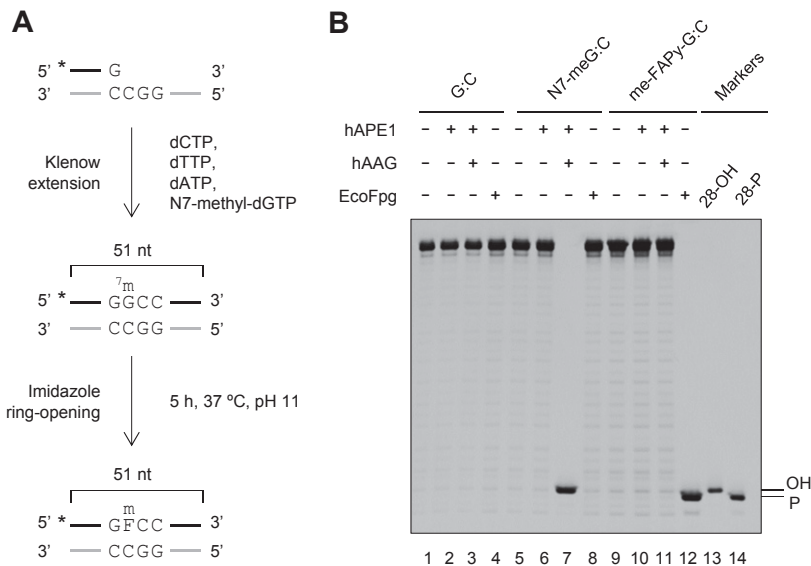


Fig. S1. Generation and characterization of DNA substrates containing N7-meG or me-FAPy-G. (A) Scheme of DNA substrate synthesis. A 5'-fluorescein-labeled 28-nt primer annealed to a 51-nt oligonucleotide was extended by *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment 3'-5' exonuclease-free) in the presence of dATP, dCTP, dTTP, and 7-methyl-dGTP for 1 h at 37 °C. The N7-meG was converted to the imidazole ring-opened form me-FAPy-G by incubation for 5 h at 37 °C in alkaline buffer (pH 11). (B) Validation of DNA substrates. DNA duplexes (20 nM) containing a 5'-end-labeled strand with a single N7-meG or me-FAPy-G opposite C were incubated with human APE1 (1 U), human AAG (2 U), or *E. coli* Fpg (8 U) at 37 °C for 8 h. Reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. Asterisks represent the fluorescent label.

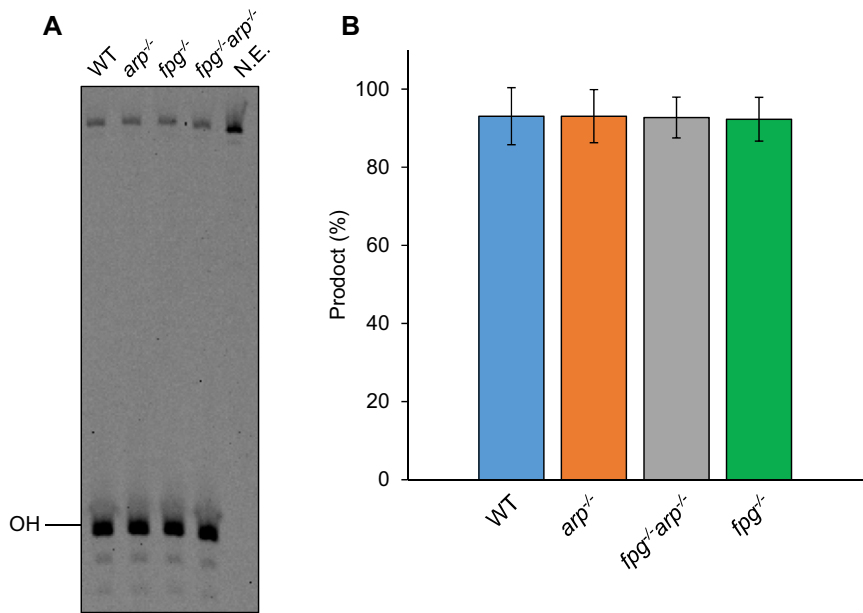


Fig. S2. Uracil DNA glycosylase activity of *Arabidopsis* cell-free extracts. Double-stranded oligonucleotide substrates (20 nM) containing a single U:C mismatch were incubated with WT, *fpg*^{-/-}, *arp*^{-/-}, or *fpg*^{-/-} *arp*^{-/-} *Arabidopsis* cell-free extracts (8 μg) for 3 h at 37 °C. Then, hAPE1 (10 U) and MgCl₂ (2 mM) were added and incubation continued for 1 h. Reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning (A). Values shown in the graph (B) are means with SEs from three independent experiments. N.E., nonextract.

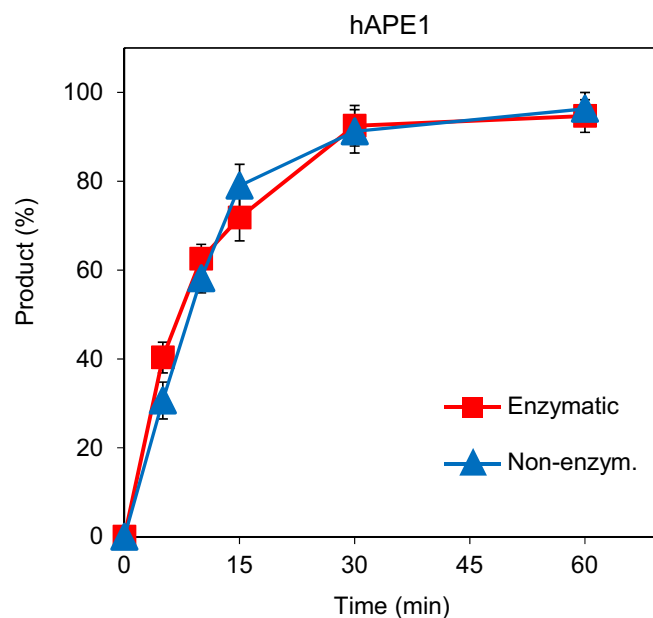


Fig. S3. Activity of hAPE1 on AP sites generated by enzymatic and nonenzymatic release of N7-meG. DNA substrates (20 nM) were a 9:1 mixture of homoduplex G:C and heteroduplex AP:C generated either by spontaneous N7-meG depurination (nonenzymatic, blue triangles) or N7-meG excision by hAAG (enzymatic, red squares). Substrates were incubated with hAPE1 (0.01 U) in the presence of 2 mM $MgCl_2$. Reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. Values are means with SEs from three independent experiments.

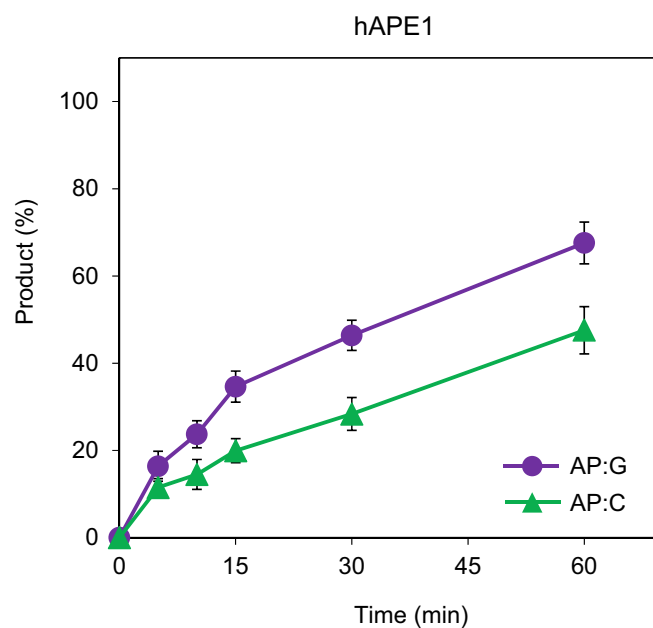


Fig. S4. Activity of hAPE1 on enzymatically generated AP sites opposite C or G. DNA substrates (2 nM) contained either a single AP:G (purple circles) or AP:C (green triangles), both generated by uracil excision. Substrates were incubated with hAPE1 (0.01 U) in the presence of 2 mM $MgCl_2$. Reaction products were separated by denaturing PAGE and detected by fluorescence scanning. Values are means with SEs from three independent experiments.

